

Phagendisplay und Hochdurchsatz- Sequenzierung: Neue Werkzeuge zur Identifizierung Peptid-basierter Materialbinder

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Carmen Juds

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans G. Börner
2. Dr. Michael G. Weller
3. Prof. Dr. Andreas Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. August 2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans G. Börner am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin sowie im Arbeitskreis von Dr. Michael G. Weller an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung in Berlin Adlershof im Zeitraum von Oktober 2015 bis Dezember 2019 angefertigt.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abstract	
1. Motivation und Zielstellung.....	1
2. Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Kleben – Das Fügeverfahren der Zukunft.....	3
2.2 Mechanismen der Adhäsion	4
2.3 Polyolefine kleben	7
2.3.1 Vorbehandlungsmethoden zur Haftverbesserung.....	8
2.3.2 Klebstoffe für die direkte Bindung auf Polyolefinen	12
2.4 Peptidbasierte Adhäsive	14
2.4.1 Selektion spezifisch bindender Peptide.....	15
2.4.2 Phagendisplay.....	17
2.5 Sanger-DNA-Sequenzierung	20
2.6 Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung	21
2.6.1 Illumina-Sequenzierung	21
2.6.2 Phagendisplay und Next-Generation-Sequenzierung	24
3. Ergebnisse und Diskussion.....	26
3.1 Auswahl und Charakterisierung der PP-Oberflächen	26
3.2 Phagendisplay.....	32
3.3 Sequenzierung der Phagen-DNA	34
3.3.1 Sanger-Sequenzierung und Sequenzanalyse	34
3.4 Vorbereitung der Phagenbibliotheken für NGS.....	41
3.4.1 Entwicklung eines Computerprogramms zur Sequenzdatenauswertung.....	43
3.5 Illumina-Sequenzierung.....	47
3.5.1 Sequenzanalyse der PP-Target-Phagenbibliotheken	47
3.5.2 Sequenzanalyse originaler Phagenbibliotheken als Referenz	52
3.5.3 Normierung der PP-Phagenbibliotheken anhand der Referenzexperimente	58
3.5.4 Vergleich der Sequenzpools verschiedener PP-Folien.....	68
3.5.5 Eigenschaftsanalyse der Peptidsequenzen	71
3.5.6 Vergleich der Illumina- und Sanger-Sequenzierung.....	75
3.6 Auswahl geeigneter Sequenzen	78
3.7 Bindungsanalyse ausgewählter Peptidsequenzen	80
3.8 Charakterisierung der Adhäsion	88
3.9 Eignung der Peptide als Haftvermittler	93
4. Zusammenfassung.....	99
5. Ausblick.....	102

6. Experimenteller Teil.....	103
6.1 Materialien	103
6.1.1 Phagendisplay	103
6.1.2 Probenvorbereitung für Illumina-Sequenzierung	104
6.1.3 Peptid- und Konjugatsynthese.....	105
6.1.4 Fluoreszenzassays und Zugversuche	105
6.2 Lösungen und Puffer	106
6.3 Messgeräte	107
6.4 Methoden.....	109
6.4.1 Molekularbiologische Methoden.....	109
6.4.2 Vorbereitung der Illumina-Sequenzierung	112
6.4.3 Sequenzanalyse der Illumina-Daten.....	113
6.4.4 Festphasensynthese der Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate.....	115
6.4.5 Fluoreszenzbasierte Adsorptions-Elutions-Experimente	116
6.4.6 Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie (Kolloidsonden-AFM).....	117
6.5 Analyse der Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate.....	119
6.5.1 Phagendisplay-abgeleitete Peptid-PEG-Konjugate	119
6.5.2 Peptid-PEG-Konjugate für den Serin-Scan.....	131
6.5.3 Kontrollsequenzen	142
6.5.4 Peptide für mechanische Adhäsionsstudien.....	148
6.5.5 Peptide für mikroskopische Adhäsionsstudien	151
7. Literatur	154
8. Anhang	160
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	160

Abstract

Polyolefins such as poly(propylene) (PP) are globally the most important plastics. Due to their low surface energy, conventional adhesives often fail to reach sufficient performance. Successful adhesion to polyolefins typically requires time-consuming and costly chemical or physical pretreatment of the surface. The development of water-based adhesive systems for polyolefins is therefore desirable.

This work presents the biocombinatorial approach of phage display for the generation of PP binding peptides. DNA sequencing of the enriched phage clones was conducted via the Illumina next-generation sequencing technology, in which whole phage libraries can be sequenced to yield millions of potentially binding sequences. Compared to traditionally used Sanger DNA sequencing, the Illumina method allows detailed statistical evaluation of the occurring amino acids and sequence properties. The conversion of the Illumina DNA raw data into peptide sequences was carried out by a specially developed computer program. Among the obtained peptides, an overall enrichment of basic amino acids and suppression of acidic amino acids was observed for all investigated PP surfaces. The systematic analysis of the sequence data revealed tendencies of the potentially binding peptides towards low hydrophobicity, good water solubility, positive net charge and large side chain volumes.

For the evaluation of the adhesion properties, several promising peptides were synthesized as poly(ethylene glycol) conjugates and investigated concerning their adsorption on PP via fluorescence-based experiments. Peptides exhibiting the highest adsorption have positive net charges and bulky aliphatic side groups in common. Further investigations using a serine sequence scan showed the importance of the basic amino acid arginine. Using XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) on the PP surfaces, a small amount of oxygen atoms was detected in addition to carbon. Angle-dependent XPS measurements indicated the presence of C-O and C=O species as well as sp^2 -hybridized carbon within the top surface layers. The results suggest a bonding mechanism through salt bridges of the positively charged guanidino group of arginine with trace amounts of O-species on the surface. In addition, hydrophobic interactions by aliphatic side chains contribute to the binding. This indicates the success of the phage display method, which allows a local read-out of the real surface with all its facets including impurities and surface defects. Colloidal probe AFM (atomic force microscopy) measurements with peptide-functionalized probes on PP reveal the work of adhesion of up to $0.8 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$. A possible application of the polypropylene-binding peptide sequences as water-based adhesion promoters was evaluated using tensile tests. Peptide coating on PP in combination with a commercial adhesive significantly enhances the bond strength compared to the uncoated surface.

Polyolefine wie Poly(propylen) (PP) sind weltweit die wichtigsten Kunststoffe. Herkömmliche Klebstoffe erreichen aufgrund ihrer geringen Oberflächenenergie oft keine ausreichende Performance. Eine erfolgreiche Haftung auf Polyolefinen erfordert typischerweise eine zeit- und kostenaufwendige chemische oder physikalische Vorbehandlung der Oberfläche. Die Entwicklung wasserbasierter Klebstoffsysteme für Polyolefine ist daher wünschenswert.

Diese Arbeit präsentiert den biokombinatorischen Ansatz des Phagen-Displays zur Identifizierung von PP-bindenden Peptiden. Die DNA-Sequenzierung der angereicherten Phagenklone wurde mittels Next-Generation Illumina Sequenzierung durchgeführt, bei welcher vollständige Phagenbibliotheken sequenziert werden können um Millionen potenziell bindender Sequenzen zu erhalten. Im Vergleich zur traditionell verwendeten Sanger-DNA-Sequenzierung ermöglicht die Illumina-Methode eine detaillierte statistische Auswertung der selektierten Aminosäuren und Sequenzeigenschaften. Die Umwandlung der Illumina-DNA-Rohdaten in Peptidsequenzen erfolgte durch ein speziell entwickeltes Computerprogramm. Unter den erhaltenen Peptiden wurde für alle untersuchten PP-Oberflächen insgesamt eine Anreicherung von basischen Aminosäuren und eine Unterdrückung von sauren Aminosäuren beobachtet. Die systematische Analyse der Sequenzdaten zeigte Tendenzen der potentiell bindenden Peptide zu geringer Hydrophobie, guter Wasserlöslichkeit, positiver Nettoladung und großen Seitenkettenvolumina.

Zur Evaluation der Adhäsionseigenschaften wurden mehrere vielversprechende Peptide als Poly(ethylenglycol)-Konjugate synthetisiert und in fluoreszenzbasierten Experimenten auf ihre Adsorption an PP untersucht. Peptide mit der höchsten Adsorption haben positive Nettoladungen und sperrige aliphatische Seitengruppen gemeinsam. Weitere Untersuchungen mit einem Serinsequenzscan zeigten die Bedeutung der basischen Aminosäure Arginin. Mit XPS (Röntgenphotoelektronenspektroskopie) auf den PP-Oberflächen wurde neben Kohlenstoff eine geringe Menge an Sauerstoffatomen nachgewiesen. Winkelabhängige XPS-Messungen zeigten das Vorhandensein von C-O- und C=O-Spezies sowie sp²-hybridisiertem Kohlenstoff innerhalb der oberen Oberflächenschichten. Die Ergebnisse deuten auf einen Bindungsmechanismus durch Salzbrücken der positiv geladenen Guanidinogruppe von Arginin mit Spuren von O-Spezies auf der Oberfläche hin. Zusätzlich tragen hydrophobe Wechselwirkungen durch aliphatische Seitenketten zur Bindung bei. Dies zeigt den Erfolg der Phagen-Display-Methode, die ein lokales Auslesen der realen Oberfläche mit all ihren Facetten inklusive Verunreinigungen und Oberflächendefekten ermöglicht. Kolloidsonden-AFM-Messungen (engl. Atomic force microscopy) mit Peptid-funktionalisierten Sonden auf PP zeigen eine Adhäsionsarbeit von bis zu 0,8 mJ·m⁻². Eine mögliche Anwendung der Polypropylen-bindenden Peptidsequenzen als wasserbasierte Haftvermittler wurde mittels Zugversuchen evaluiert. Die Peptidbeschichtung auf PP in Kombination mit einem handelsüblichen Klebstoff erhöht die Klebkraft im Vergleich zur unbeschichteten Oberfläche deutlich.

1. Motivation und Zielstellung

Im 21. Jahrhundert gewinnt das Kleben im Vergleich zu anderen Fügetechniken an Bedeutung. Ob im PKW oder Flugzeug, in Glasfaserkabeln oder auf Operationstischen - Klebstoffe finden sich überall. Mobilität^[1], Kommunikation^[2], Bauwesen^[3], Medizin und Hygiene^[4], sowie der Großteil der Produkte des täglichen Lebens werden in ihrer modernen Form durch geklebte Verbundwerkstoffe erst ermöglicht. Zu den Materialien, welche sich aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften oft nicht ausreichend gut kleben lassen, gehören die Polyolefine. Die beiden wichtigsten Vertreter dieser Produktklasse, Polyethylen und Polypropylen, stellen den größten Anteil der über 170 Millionen Tonnen jährlich produzierten Polyolefine dar.^[5] Aufgrund ihrer geringen Oberflächenenergie und Apolarität haften Klebstoffe im Allgemeinen schlecht auf Polyolefinoberflächen. Aufwendige Vorbehandlungen sowie der Einsatz meist toxischer Chemikalien als Haftvermittler sind daher gängige Praxis in der Polymerindustrie.^[6] Insbesondere wasserbasierte Klebsysteme für Polyolefine sind wünschenswert, jedoch bisher kaum realisiert. Bei einem Verzicht auf organische Lösungsmittel sinken nicht nur die Verfahrenskosten, sondern auch die ökologische Belastung.

Eine Möglichkeit wasserbasierte Klebstoffe zu entwickeln, bietet die Welt der Proteine und Peptide. Mit zwanzig proteinogenen Aminosäuren ist die Natur in der Lage, unzählige Funktionen zu ermöglichen, zu denen auch natürliche Haftproteine, beispielsweise in der marinen Muschel, zählen. Für die Selektion neuartiger selektiv-bindender Peptide bietet die biokombinatorische Methode des Phagendisplay einen interessanten Ansatz.^[7] Die Mitte der 80er Jahre entwickelte Methode ist derart erfolgreich und vielfältig angewendet, dass der Erfinder George P. Smith im Jahr 2018 mit dem Chemienobelpreis ausgezeichnet wurde. Beim Phagendisplay wird die DNA der Phagenviren modifiziert, indem randomisierte Peptidsequenzen insertiert werden. Diese werden dann als Teil der natürlichen Phagenproteine exprimiert. In einem Selektionsprozess werden diese Phagen der gewünschten Zielstruktur ausgesetzt, wobei sich bindende Phagenklone anreichern. Am Ende des Phagendisplay-Experiments muss die DNA der Phagen sequenziert werden, um die Sequenz des bindenden Peptids zu erhalten. Bisher sind diese DNA-Sequenzierungen größtenteils mit der, nach ihrem Pionier benannten, Sanger-Methode^[8] durchgeführt worden. Dafür ist es notwendig, einzelne Phagenklone getrennt zu sequenzieren, was die Anzahl an möglichen Sequenzen stark limitiert. Aus Millionen Phagen können so maximal einige hundert potentiell bindende Peptidsequenzen ausgewählt werden. Die Sequenz mit der höchsten Affinität zum verwendeten Substrat ist jedoch nicht notwendigerweise in diesem limitierten Sequenzpool enthalten.

Neue Hochdurchsatzmethoden (auch Next-Generation-Sequenzierung, NGS) haben die DNA-Sequenzierung im Verlauf des letzten Jahrzehnts revolutioniert.^[9] Durch Immobilisierung wurde die parallele Sequenzierung großer Mengen an DNA-Fragmenten ermöglicht, welche neben der enormen Steigerung des Durchsatzes auch eine beachtliche Kostensenkung bewirkte. Im Bereich der Gesamt-Genom-Sequenzierung ist NGS bereits zur Standard-Methode geworden, während zur Analyse von Phagendisplay-Experimenten nach wie vor weitgehend die Sanger-Sequenzierung angewendet wird. Obwohl seit einigen Jahren zunehmend Arbeiten veröffentlicht werden, in welchen Phagenbibliotheken durch Hochdurchsatzmethoden sequenziert wurden, behandeln diese ausschließlich biologische Zielstrukturen wie Antikörper oder Zellen.^[10] Auch im Bereich der Materialforschung wird Phagendisplay seit Langem angewendet, bisher jedoch nicht in Kombination mit NGS.^[11] Über NGS-Verfahren wird die parallele Sequenzierung gesamter Phagenbibliotheken möglich und erlaubt eine deutlich verbesserte Auswertung über statistische Methoden.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Kombination aus Phagendisplay und Next-Generation-Sequenzierung Peptide mit einer starken Affinität für Polyolefine, speziell Polypropylen (PP), zu generieren. Phagendisplay soll dabei auf schwerklebbaren PP-Folien durchgeführt werden, welche als technische Produkte von der Firma Henkel bereitgestellt werden. Die anschließende DNA-Sequenzierung der Phagen erfolgt vergleichend über Sanger-Sequenzierung und parallel über NGS. Mit der Sanger-Methode können einzelne Phagenklone nach bereits etablierter Vorbereitung sequenziert werden. Für eine erfolgreiche Sequenzierung mit einer NGS-Methode ist dagegen die Anreicherung des gefragten Abschnitts der Phagen-DNA notwendig, welche über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) geschehen soll. Während die Sanger-Daten manuell ausgewertet werden können, ist für die Analyse der enorm umfangreichen NGS-Daten die Entwicklung eines Computerprogramms nötig. Das in Kooperation mit Dr. Tim Conrad (FU Berlin) entwickelte Programm soll dabei zunächst die DNA-Rohdaten jedes sequenzierten Phagenklons in die entsprechende Peptidsequenz übersetzen. Anschließend erfolgt eine detaillierte statistische Auswertung der erhaltenen Sequenzen bezüglich ihrer Eigenschaften und der angereicherten Aminosäuren, welche Rückschlüsse auf die Mechanismen der Peptid-PP-Bindung geben sollen. Im Folgenden soll eine Evaluation der Bindungseigenschaften ausgewählter Peptidsequenzen, sowohl aus dem Sanger- als auch NGS-Sequenzpool, mittels fluoreszenzbasierter Adsorptionsexperimente sowie Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie (engl. colloidal probe atomic force microscopy, AFM) erfolgen. Eine potentielle Anwendung bindender Peptide als Haftvermittler in Kombination mit einem kommerziellen Klebstoff soll abschließend durch Zugversuche untersucht werden.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Kleben – Das Fügeverfahren der Zukunft

Schon in der Steinzeit waren Fügeverfahren wie Klemmen oder Keilverbindungen zur Herstellung von Werkzeugen bekannt. Auch das Prinzip des Verbindens zweier Teile durch natürliche klebstoffähnliche Substanzen, wie Pech oder Bitumen, wird seit Jahrtausenden praktiziert.^[12] Der berühmte „Ötzi“, eine in einem Alpengletscher gefundene über 5000 Jahre alte Mumie, besaß ein Beil mit einer mittels Birkenpech geklebten Klinge.^[13] Die Mesopotamier verwendeten 4000 v. Chr. Asphalt zum Bauen, die Sumerer stellten 3000 v. Chr. Leim aus Tierhäuten her und ab 2000 v. Chr. finden sich geklebte Figuren. Ab ca. 1500 v. Chr. erzeugten die Ägypter Tierleime. In einer ägyptischen Grabkammer wurde eine 3500 Jahre alte Leimtafel gefunden und untersucht, wobei der Leim das gleiche Verhalten zeigt wie tierischer Glutinleim der noch vor 100 Jahren verwendet wurde.

Obwohl sie vielfältig genutzt wurden, haben sich Klebstoffe Jahrtausende lang wenig verändert. Dies ändert sich mit Beginn der Industrialisierung, als das Kleben zur bedeutendsten Füge-technik für das Verbinden nichtmetallischer Werkstoffe wurde.^[14]

Größere Fortschritte im Klebstoffbereich, wie die Erfindung von Haftklebstoffen auf Naturkautschukbasis, die zum Beispiel zu selbstklebenden Pflastern führten, wurden im 19. Jahrhundert gemacht.^[14] 1909 wird der erste synthetische Klebstoff, bestehend aus härtbaren Phenolharzen, hergestellt, welcher sich im aufkommenden Flugzeugbau als nützlich erweist. In den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts gelingt ein weiterer Durchbruch durch die Entwicklung des ersten Klebebands durch Richard G. Drew von der amerikanischen Minnesota Mining and Manufacturing Company (3M). Anschließend folgt die Entwicklung verschiedener Polymere, wie Polyvinylacetat, welches als Rohstoff für Klebstoffe bis heute von Bedeutung ist. Dazu kommen Melamin-, Epoxid-, und Silikonharze sowie Polyurethane und Acrylate in den 30er bis 50er Jahren und 1958 der erste Cyanacrylat-basierte Klebstoff.^[13]

Heutzutage bietet das Kleben gegenüber anderen Fügeverfahren entscheidende Vorteile. Es lassen sich im Gegensatz zu Schrauben, Nieten, Löten und Schweißen unterschiedliche Materialien miteinander verbinden. Auch das Kleben wärmeempfindlicher Werkstoffe ist durch niedrige Prozesstemperaturen möglich. Klebeverbindungen ermöglichen eine flächige Kraftübertragung, wodurch die gleichmäßige Verteilung der Kräfte über die gesamte Klebfläche erreicht wird und höhere Belastungen übertragbar sind. Temperaturschwankungen und Bewegungen der Füge-teile zueinander sind weniger problematisch als beim Schrauben und Nieten. Darüber hinaus sind Klebprozesse

automatisierbar und vergleichsweise kostengünstig. Die energiesparenden Leichtbauweisen des 21. Jahrhunderts steigern die Bedeutung von Klebstoffen noch zusätzlich. Beispielsweise ist bei der Produktion eines Autos eine Gewichtseinsparung von 25 kg pro kg verwendeten Klebstoffs möglich und es werden typischerweise 15-18 kg Klebstoff pro PKW verwendet.^[15] Biotechnologisch hergestellte Klebstoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe wie Lignin, Stärke oder Saccharose ebnen den Weg in eine nachhaltigere Zukunft.^[16] Auch in der Medizin werden zunehmend Klebstoffe zum Einsatz kommen. Das Nähen von Operationswunden wird durch das schnellere und einfachere Kleben mit Spezialklebstoffen ersetzt, wodurch das Infektionsrisiko sinkt.^[4b] Die Klebstoffindustrie ist daher seit Jahren auf Wachstumskurs. Weltweit gibt es etwa 1500 Klebstoffhersteller mit 250.000 Produkten, davon 100 traditionelle Unternehmen aus Deutschland mit mehr als 13.000 Beschäftigten.^[13]

2.2 Mechanismen der Adhäsion

Obwohl das Kleben seit Jahrtausenden bekannt ist, wurden erst innerhalb des letzten Jahrhunderts Theorien über die zugrundeliegenden Mechanismen der Haftung aufgestellt, welche Bedeutung für Materialwissenschaften, Ingenieurwesen und Biomedizin erlangten. Entscheidend sind Oberflächeneigenschaften des Substrats wie chemische Funktionalitäten, Härte, Rauheit und thermodynamische Eigenschaften wie die Oberflächenenergie. Die entscheidenden Eigenschaften des Klebstoffs sind das Molekulargewicht und Aushärtungsverhalten sowie Viskoelastizität, Fließverhalten und der thermische Übergang des Polymers. Das Phänomen der Haftung ist zu komplex für nur eine Theorie, was zur Entwicklung verschiedener Theorien geführt hat, die im Folgenden kurz erläutert werden.^[1c]

Mechanische Haftung

Die Größenskala für die mechanische Haftung ist deutlich größer als für auf Ladungswechselwirkungen basierende Haftung. Sie beruht auf Reibung oder Verzahnung. Der Klebstoff dringt in Unebenheiten oder Poren des Substrates ein, sodass es nach dem Aushärten zum mechanischen „Verkeilen“ kommt.^[1c] Hierbei sind die mechanischen Eigenschaften des Klebstoffs von Bedeutung, sowie die Geometrie und Rauheit der Substratoberfläche. Ein Aufrauen der Oberfläche führt zu stärkerer Haftung. Eine gute Adsorption des Klebstoffs auf der Substratoberfläche ist wichtig, da diese erst das Eindringen des Klebstoffs ermöglicht. Zur Zeit konzentriert sich die Forschung hierzu auf Mikro- und Nanomaterialien.^[17] In der Polymerforschung werden mechanisch verzahnende

makromolekulare Systeme^[18] entwickelt, um die Haftung in Polymerkompositen zu erhöhen.^[17a]

Elektrostatische Theorie

Die elektrostatische Theorie, vorgeschlagen 1948^[19], beruht auf den elektrischen Feldern geladener Partikel oder Dipolmomenten. Die Haftung wird demnach von elektrostatischen Kräften zwischen der mobilen Phase und dem Substrat erzeugt. Die Theorie beschreibt beispielsweise treffend die Haftung von Feststoffen auf Oberflächen^[19-20], wie auch die elektrostatische Selbstassemblierung in Lösung im Bereich der Nanowissenschaften.^[20a, 21] In den letzten Jahren wurden biomimetische Adhäsive, inspiriert von der Geckofuß-Haftung, entwickelt^[22]. Hierbei wurden Teflonpolymere in Form von Nanopillars (Nanosäulen) verwendet, deren Haftung im Gegensatz zu den Geckos, die sich hauptsächlich van-der-Waals-Wechselwirkungen zunutze machen, auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht.^[22a]

Thermodynamische Theorie

Nach der Thermodynamischen Theorie sind die Oberflächenspannung bei Flüssigkeiten, bzw. die freie Oberflächenenergie bei Festkörpern, wichtige Eigenschaften für die Haftung.^[23] Die Bindung entsteht durch lokale intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Substrat und Klebstoff, wobei eine möglichst große Kontaktfläche entscheidend für eine starke Haftung ist. Im typischen Fall der Auftragung eines flüssigen Klebstoffs auf ein festes Substrat, ist für eine maximale Kontaktfläche eine gute Benetzbarkeit nötig. Klebstoffe benetzen die Oberfläche dann, wenn die freie Oberflächenenergie größer ist als die des Klebstoffs. Dies ist vor allem beim Kleben niederenergetischer Oberflächen, wie sie bei Polyolefinen oder Teflon vorliegen, problematisch. Der polare Anteil an der Oberflächenenergie wird daher oft durch Aktivierung der Oberfläche erhöht, was zu einer verbesserten Benetzbarkeit und damit auch zu einer besseren Haftung führt.

Diffusionstheorie

Die Theorie der Diffusion wurde erstmals von Voyutskii und Vakula in Bezug auf Polymer-Polymer-Wechselwirkungen beschrieben.^[24] Zwei Materialien, die ineinander löslich sind, vermischen sich bei Kontakt unter Erhitzen, wobei Kettenelemente in das jeweils andere Polymer eindringen und beim Aushärten eine stabile Grenzfläche bilden. Meist handelt es sich um ein niedermolekulares Polymer in Lösung, welches in ein zweites Polymer diffundiert und zu einer Verschlaufung auf molekularer Ebene führt. Durch die hierbei entstehende Mischphase gibt es keinen abrupten Wechsel der Materialeigenschaften. Dieser Mechanismus

bildet die Grundlage für das weitverbreitete Kunststoffschweißen, welches klebstofffrei abläuft und zum Beispiel bei Bauteilen aus Polyolefinen oder PVC angewendet wird.^[25]

Kovalente Bindung

Die kovalente Bindung zwischen zwei Atomen, die sich ein Elektronenpaar teilen, ist für ein Material ca. 1000-fach stärker als die freie Oberflächenenergie des gleichen Materials.^[1c] Kovalente Bindungen zwischen Klebstoff und Substrat verbessern die Stärke und Dauer der Haftung enorm. Die Verbindung zweier verschiedener Materialien durch Haftvermittler, die diese überbrückend kovalent verbinden, ist zum Beispiel vorteilhaft bei Kompositmaterialien. Hierzu seien Polypropylen-Talk-Komposite aufgeführt, ein verbreitetes Komposit, für welches häufig Silane als Haftvermittler eingesetzt werden um kovalente Bindungen zu erzeugen.^[26]

Wasserstoffbrückenbindung

Wasserstoffbrückenbindungen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Haftung und sind darüber hinaus allgegenwärtig. Sie formen DNA zu Chromosomen und Polypeptide zu Haaren, Muskeln oder Enzymen.^[27] Früher hielt man Wasserstoffbrückenbindungen für schwache Bindungen und verortete deren Stärke im Bereich von Van-der-Waals-Kräften.^[1c] Heute weiß man, dass sie durchaus stärker werden können und bis zu 30 kJ/mol für O-H...O und bis zu 188 kJ/mol für HF-Spezies erreichen können (Tabelle 1).^[27]

Tabelle 1. Bindungsstärken verschiedener Bindungen.^[1c, 28]

Bindungsart	Bindungsstärke (kJ/mol)	Bindungslänge
Elektrostatisch	418	0,1 - 1 µm
Van-der-Waals	8,4 - 21	0,5 – 1,0 nm
Kovalente Bindung	147 - 628	0,1 – 0,2 nm
Wasserstoffbrückenbindung (neu) ^[27]	4,2 - 188	0,15 – 0,45 nm
Wasserstoffbrückenbindung (alt)	12,6 – 25,1	0,1 – 0,3 nm

Theorie der schwachen Grenzschichten

Die Theorie der schwachen Grenzschichten (*engl. weak boundary layer*) wurde von Bikerman et al. vorgeschlagen und basiert auf Verunreinigungen an der Grenzfläche, welche mechanischer (Luftblasen, Beschädigungen, Verunreinigungen) oder chemischer (Additive, gealterte/verwitterte Oberfläche) Art sein können.^[29] Good et al. gehen davon aus, dass diese schwachen Grenzflächen für Haftversagen an Kunststoffoberflächen verantwortlich sein können.^[30] Bei sauberen Oberflächen spielt das keine Rolle, teilweise lassen sich jedoch schwache Grenzschichten nicht vermeiden oder entfernen. Schönhorn und Hansen zeigten, dass die Haftung von Epoxidharz auf PE, welches mit Inertgas beschossen wurde, steigt, obwohl die Oberflächenspannung unverändert bleibt.^[31] Ebenso führt der Beschuss von PE

mit UV-Strahlung, zu deutlich besserer Haftung des Epoxidharzes obwohl mittels IR und Kontaktwinkelmessungen keine Oxidation der Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Es werden daher Quervernetzungen auf der Oberfläche angenommen, welche die schwachen Grenzschichten eliminieren.^[32]

Anhand der verschiedenen Theorien soll die Komplexität des Phänomens der Haftung deutlich werden. Da bisher keine einheitliche Theorie beschrieben wurde, ist es erforderlich, die verschiedenen Theorien je nach untersuchtem Klebstoff und Substrat zu kombinieren. Eine besondere Herausforderung stellt die Haftung auf Polyolefinen dar, auf welche im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

2.3 Polyolefine kleben

Heutzutage dominieren thermoplastische Kunststoffe, welche sich durch schnelle und einfache Herstellung und eine geringe Dichte auszeichnen. Weiterhin sind mögliche Anpassungen der molekularen oder morphologischen Struktur an mechanische, physikalische oder chemische Anforderungen möglich.^[15] Der Großteil der technisch und wirtschaftlich wichtigen Thermoplaste, vor allem Polyolefine sind jedoch aufgrund ihrer niedrigen Oberflächenenergie und Apolarität schlecht klebbar. Für die vielfältigen Anwendungen der Polyolefine, welche von der Automobilindustrie^[33] über Verpackungen^[34] bis zur Medizin^[35] reichen, ist die Haftung von Klebstoffen, Beschichtungen oder Farben oftmals erforderlich. Die wichtigsten Polyolefine PP und PE sind schlecht benetzbar und die ohnehin niedrige Oberflächenenergie wird wegen des Fehlens polarer Gruppen von dispersiven Wechselwirkungen dominiert (Tabelle 2). Zusätzlich sind Polyolefine schlecht löslich bzw. quellbar, das heißt das Kleben mit lösemittelhaltigen Klebstoffen auf Basis des Diffusionsmechanismus ist schlecht realisierbar. Daher kommt fast ausschließlich Adhäsion in Frage, welche auf atomaren und zwischenmolekularen Wechselwirkungen vorrangig polarer Gruppen in der Ober- und Grenzflächenschicht zwischen Fügepart und Klebstoffmolekül beruht. Eine Vorbehandlung ist üblicherweise zur Verbesserung der Haftungseigenschaften erforderlich. Diese chemische und/oder physikalische Oberflächenmodifikation, die sogenannte „Aktivierung“ der Oberfläche, meist die Erzeugung polarer Gruppen in der Oberflächenschicht, sorgt für eine ausreichende Benetzung und damit für eine stärkere Haftung. Im Folgenden werden verschiedene Methoden der Aktivierung beschrieben.

Tabelle 2. Oberflächenenergien und Kontaktwinkel einiger ausgewählter Kunststoffe.^[36]

	Freie Oberflächenenergie [mJ/m ²]	Kontaktwinkel mit Wasser [°]
Polyester	41	70
Polystyrol	34	72
Polypropylen (PP)	30	88
Polyethylen (PE)	30	88
Polytetrafluorethylen (PTFE)	19	120
Zum Vergleich: Kupfer (111)	ca. 1800 ^[37]	15 ^[38]

2.3.1 Vorbehandlungsmethoden zur Haftverbesserung

2.3.1.1 Mechanische und chemische Methoden

Eine Verbesserung der Hafteigenschaften lässt sich über verschiedene Mechanismen erreichen. Dazu gehören die Aufrauung der Oberfläche, die Entfernung schwacher Grenzschichten und die Einführung polarer Gruppen. Erstere Effekte sind durch Reinigung mit verschiedenen Lösungsmitteln, durch simples Schleifen oder Bürsten der Oberfläche sowie durch mechanische Strahlverfahren erreichbar.^[15] Hierbei werden meist mineralische Strahlmittel wie Korund oder Glasperlen oder metallische Strahlmittel wie Stahl oder Aluminium auf die Substratoberfläche geschossen, wodurch die oberste Schicht abgetragen und die Oberfläche angeraut wird. Beim Vakuumsaugstrahlen wird gleichzeitig durch Unterdruck eine Freisetzung der entfernten Partikel vermieden. Beim Sandblast-Coating(SaCo)-Verfahren wird mit einem speziellen Strahlmittel gearbeitet (Korund mit Silikatisierung), welches einen Silikatfilm auf dem Substrat hinterlässt und somit zusätzlich zur Reinigung haftvermittelnd wirkt. Ein rückstandsfreies Verfahren ist das Trockeneisstrahlen, bei welchem thermische Wechselwirkungen zusätzlich zur kinetischen Energie der CO₂-Kristalle zur Entfernung der Kontaminationen beitragen.

Zur Einführung von polaren funktionellen Gruppen auf der Polyolefinoberfläche können chemische Verfahren wie das Beizen oder die Gasphasenfluorierung eingesetzt werden. Beim Beizen wird die Oberfläche durch Chemikalien wie Säuren oder Laugen angeätzt, wobei auch Oxidationsmittel wie Chromtrioxid oder Kaliumpermanganat zugesetzt werden. Auf diese Weise werden vor allem Carboxyl- und Carbonylfunktionen eingeführt.^[39] Durch die Vorbehandlung mit Lösungsmitteln wie Xylol und Toluol werden ebenfalls bessere Hafteigenschaften der Polyolefinen erhalten.^[40] Weiterhin wurde gezeigt, dass eine stärkere Haftung basierend auf der Einführung von Chloratomen auf Polyethylen durch eine Mischung aus Säure und Hypochloriden erreicht werden kann.^[41] All diese Methoden haben den

entscheidenden Nachteil, dass große Mengen giftiger Chemikalien zur Entsorgung anfallen und werden daher kaum noch großtechnisch angewendet. Gasphasenfluorierung wird dagegen besonders bei Folien eingesetzt und zeichnet sich durch eine hohe Prozesssicherheit und eine Langzeitstabilität über Monate aus. Eine Fluorierung wird erreicht indem der Kunststoff kurz in einer Reaktionskammer einem Fluor/-Inertgasgemisch ausgesetzt wird, wobei Wasserstoffatome des Polymers durch Fluor ersetzt werden. Das hohe Oxidationspotential von Fluor führt zu Hydrophilisierung der Oberfläche, womit eine verbesserte Benetzbarkeit und Haftung erzielt wird.

2.3.1.2 Physikalische Methoden

Technische Bedeutung im Bereich der Oberflächenmodifizierung von niederenergetischen Kunststoffen erlangten vor allem physikalische Methoden wie Plasma-, Laser- oder Flammenverfahren, welche meist sehr effizient und umweltverträglich sind.^[15, 42] Am Beispiel von PP wurde gezeigt, dass eine Plasmabehandlung die Bildung von sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen, wie CO aber auch COO, OH und OOH, an der Oberfläche induziert.^[43] Typischerweise wird durch elektrische Entladungen das umgebene, meist sauerstoffhaltige Gas ionisiert, wodurch hochreaktive Spezies entstehen, die mit der Oberfläche reagieren können. Besonders geeignet für Polyolefine sind Niederdruckplasmaverfahren, wobei durch den niedrigen Druck bei geringer Temperatur gearbeitet werden kann und das Schmelzen des Polymers verhindert wird. Ein Nachteil ist die Reversibilität der Haftverbesserung, das heißt, durch Reaktion mit Verunreinigungen oder durch Reorientierung auf der Oberfläche tritt ein Alterungsprozess ein und die hydrophobe Eigenschaft der Oberfläche wird wiederhergestellt.^[42] Durch Plasmapolymerisation ist es möglich, zusätzlich zur Aktivierung der Oberfläche mit Hilfe des Plasmas ein Monomer zu aktivieren und aufzutragen, sodass eine haftvermittelnde Schicht entsteht. Durch Verwendung von Siliziumverbindungen lässt sich darüber hinaus eine langzeitstabile Oberflächenmodifizierung erreichen.

Weiterhin können Reaktionen des Polymers mit Sauerstoff durch Verwendung von UV-Strahlung einer Wellenlänge unter 200 nm erreicht werden. Laserverfahren im Bereich von UV-IR-Wellenlängen verdampfen einen Teil des Kunststoffs, wodurch gleichzeitig Kontaminationen entfernt werden. Beflammen des Kunststoffs mittels des sauerstoffreichen, blauen Teils der Flamme eines Propan- oder Methangas-Luftgemisch kann ebenfalls für die Aktivierung genutzt werden. Der Effekt ist hierbei allerdings deutlich kurzlebiger als bei der Plasmabehandlung. Ein weiteres Problem ist die Hitzeentwicklung, welche eine schnelle

Applikation und bei Folien auch eine Kühlung über Walzen notwendig macht um das Schmelzen zu verhindern. Beim Silikatisieren wird eine haftvermittelnde Silikatschicht über flammenpyrolytische Abscheidung aufgetragen. Dabei wird eine Si-organische Verbindung unter Hitze zersetzt und als $\text{SiO}_x\text{-C}$ Schicht abgeschieden. Ein Silanhaftvermittler führt dann zu einer starken Haftung zwischen Silikatschicht und Klebstoff.^[15]

Die am meisten verwendete Aktivierungsmethode für Polypropylen und Polyethylen stellt die Corona-Behandlung dar, die meist *inline* am Ende des Fertigungsprozesses stattfindet.^[44] Eine hochfrequente Spannung zwischen zwei nahe beieinander liegenden Elektroden bewirkt die Ionisierung der Luftmoleküle. Durch das dazwischen befindliche Polymer entlädt sich die Spannung nicht in Form eines Lichtbogens, sondern führt zur Entstehung eines bläulichen Lichtes, das als „Corona“ bezeichnet wird. In der Corona kommen verschiedene hochreaktive Sauerstoffspezies vor, die Radikale O^\bullet und O_2^\bullet sowie Ozon O_3 , welche eine Reaktion mit polaren Molekülen wie Wasser und anschließend mit dem Polyolefin ermöglichen. Mechanistische Studien zeigten, dass über Peroxid-Intermediate Alkoxyradikale entstehen, welche dann mit Hydrocarbonradikalen sowie Hydroxyradikalen reagieren (Abbildung 1).^[44]

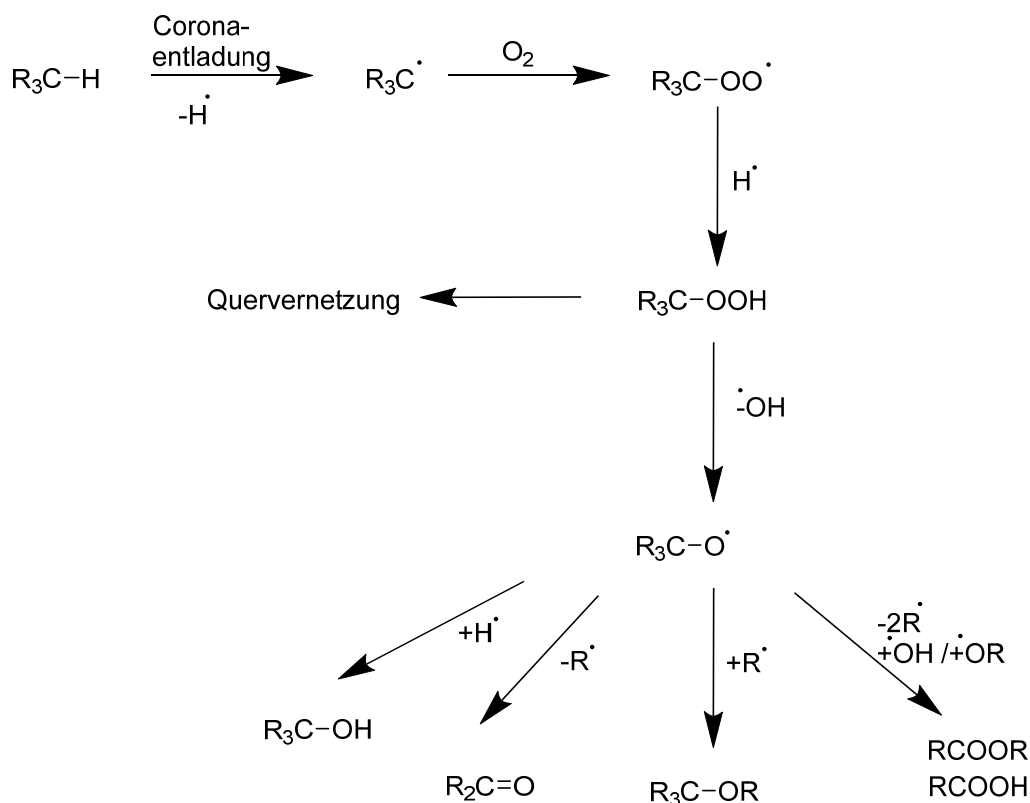


Abbildung 1. Mechanismen der Oxidationsprozesse an Polyolefinen während der Corona-Behandlung.^[44]

Über IR-Spektroskopie und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) auf der aktivierten Oberfläche wurden hauptsächlich Keton-, Aldehyd- und Säuregruppen nachgewiesen, aber auch die Hydroperoxidintermediate ROOH , RO_2R und RO_3R . Durch Variieren der Energie und der Luftfeuchtigkeit können außerdem Quervernetzungen oder Kettenbrüche auftreten, welche in einem höheren oder niedrigeren Molekulargewicht resultieren. Mittels einer Stickstoffcorona können andere Oberflächeneigenschaften erzielt werden, sodass im Vergleich zur Aktivierung mit Sauerstoff eher saure als basische Klebstoffe verstärkt adsorbiert werden. Zusätzlich zur chemischen Modifikation bewirkt die Coronabehandlung die Veränderung der Oberflächenmorphologie. Durch die entstehenden hochenergetischen Partikel bilden sich kleine Löcher in der Oberfläche, welche die Haftung über mechanische Verzahnung erhöhen können.

2.3.1.3 Haftvermittler und Primer

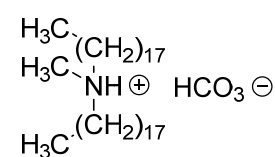
Haftvermittler sind Chemikalien, die an der Grenzfläche zwischen Substrat und der Beschichtung oder des Klebstoffs wirken und eine starke Bindung zu beiden Materialien ausbilden. Sie werden entweder direkt auf die Substratoberfläche aufgetragen, wo sie eine Monolage ausbilden, oder mit dem Beschichtungsmaterial vor der Applikation vermischt. Aufgrund der herausragenden Eigenschaften werden Organosilane am häufigsten als Haftvermittler eingesetzt, hauptsächlich jedoch für anorganische Substrate wie Metalle oder Glas.^[45] Für unbehandelte Polyolefine erweisen sie sich oft als ineffizient, dagegen zeigt jedoch beispielsweise eine Kombination aus Beflammen und einem Silanhaftvermittler eine stark verbesserte Haftung auf Polypropylen.^[46]

Primer sind niedrigviskose, filmbildende Systeme, die vor dem Kleben auf die Substratoberfläche aufgetragen werden und diese gut benetzen.^[15] Die Aufbringung der Primer in geringer Schichtdicke ($< 10 \mu\text{m}$) lässt sich einfach manuell mit Hilfe von Pinseln oder Schwämmen durchführen und die Klebung kann nach wenigen Minuten erfolgen. Meist enthalten die verwendeten Substanzen unpolare sowie polare Gruppen um eine starke Bindung zwischen unpolarem Polyolefin und eher polarem Klebstoff zu ermöglichen. Eine Klasse verwendeter Primer besteht aus chlorierten Polyolefinen (CPO), welche PE- oder PP-basiert sind und meist in lösungsmittelbasierten Systemen verwendet werden. CPOs werden hauptsächlich verwendet um die Haftung von Farben auf Polyolefinen zu erhöhen, können aber auch zur verbesserten Haftung von Klebstoffen führen.^[36] Es wird meist angenommen, dass Polymerketten des CPOs in das Polyolefin diffundieren und der haftungsverbessernde Effekt auf der Erhöhung der Polarität und damit der Benetzbarkeit durch den Chloranteil

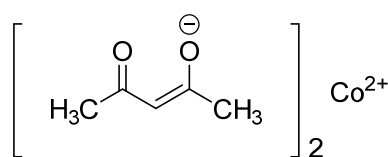
beruht. In einer mechanistischen Studie mit chloriertem PP auf einem PP-Substrat konnte jedoch keine Diffusion des CPO in das PP festgestellt werden, woraus geschlossen wird, dass reine Dispersionswechselwirkungen zwischen CPO und PP ausreichend sind.^[47]

Eine weit verbreitete Klebstoffklasse, die Cyanacrylate, haften besonders schlecht auf Polyolefinen, weil die Oberflächenenergie des Klebstoffs viel größer als die des Substrats ist. In den letzten Jahrzehnten wurden eine Reihe von Polyolefin-Primern, meist Amine, quaternäre Ammoniumsalze oder Phosphine, entwickelt, welche die Verwendung von Cyanacrylat-basierten Klebstoffen ermöglichen. Okamoto verglich den haftverbessernden Effekt verschiedener Amine und Ammoniumcarboxylate mit langen Alkylketten auf Polyolefinen, wobei sich Trialkylammoniumcarboxylate als überlegen herausstellten (Abbildung 2).^[48] Yang zeigte, dass Vorbehandlungen mit Triphenylphosphin oder Cobaltacetylacetonat in Kombination mit Ethylcyanacrylat zu einer sehr starken Bindung führen, die auch längeres Kochen in Wasser toleriert.^[49] Der Primer diffundiert in die Polymeroberfläche und ermöglicht so die Verschlaufung von Polyolefin und Klebstoff. Zusätzlich initiiert der Primer die Polymerisation des Cyanacrylats, welche zum Aushärten führt. Matsumoto et al. verwendeten ebenfalls Cobaltacetylacetonat-Komplexe, mit welchen sich industriell relevantes, isotaktisches PP als *isPP*/Cyanoacrylat/*isPP* kleben lässt.^[50]

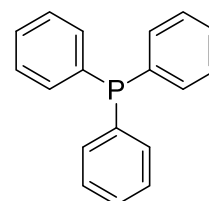
Fast alle der beschriebenen Vorbehandlungs- und Primingmethoden werden industriell angewendet, weil trotz der Nachteile eines höheren Prozessaufwands, höherer Kosten oder der Entstehung von toxischen Abfallprodukten, auf die Verwendung von Polyolefinen bisher kaum verzichtet werden kann. Seit einigen Jahren existieren Klebstoffe für die direkte Bindung auf niedrigerenergetischen Kunststoffoberflächen ohne Notwendigkeit einer Vorbehandlung, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.



**Distearylmethyl-
ammoniumcarboxylat**



Cobalt(II)acetylacetonat



Triphenylphosphin

Abbildung 2. Verschiedene Primer für Polyolefine.^[48-49]

2.3.2 Klebstoffe für die direkte Bindung auf Polyolefinen

Klebstoffe, die sich für die direkte Bindung auf Polyolefinen eignen, sind meist polyacrylatbasierte Systeme als Haftkleber (engl. pressure sensitive adhesives, PSA). PSA sind

viskoelastische Materialien, die unter leichtem Druck eine starke Haftung auf festen Oberflächen ausbilden. Typischerweise werden umweltfreundliche wasserbasierte Polyacrylat-PSA, verwendet, die jedoch schlecht auf unbehandelten Polyolefinen haften. Durch die Einführung von hydrophoben Monomeren kann die Affinität zu Polyolefinen gesteigert werden, wodurch aber die Verwendung von Lösungsmitteln nötig wird. Eine andere Klasse von Polyolefinklebern bilden Polyacrylate, deren Polymerisation durch Trialkylborane bei Raumtemperatur initiiert werden kann. Sonnenschein et al. zeigten, dass solche Polyacrylate auf den Polyolefinen PE und PP sowie Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyvinylidendifluorid zu starker Haftung führen.^[51] Der zugrundeliegende Mechanismus wurde eingehend untersucht und basiert auf der Freisetzung von Alkylradikalen durch das Boran, welche die Polymerisation des Acrylats initiieren.^[51-52] Interessanterweise reagieren die Radikale ebenfalls mit dem Polyolefin, sodass kovalente Bindungen zum Polyacrylat gebildet werden. Die anfänglichen Probleme der Polyacrylate in Bezug auf Sprödigkeit und schlechte schichtbildende Eigenschaften konnte durch die Verwendung von Poly(acrylat/epoxid)- und Poly(acrylat/siloxan)-Hybriden nur teilweise gelöst werden.^[53] Die Copolymerisation von Polyacrylaten mit Polyurethan überwindet diese Nachteile weitestgehend.^[54] Kommerziell genutzte Systeme enthalten zur Zeit entweder Borhydride bzw. -metallsalze (I) oder Trialkylboranaminsalze (II) (Abbildung 3). Mit solchen organoboranbasierten Systemen können für Klebungen von Polypropylen Bruchfestigkeiten von über 10 MPa (100 bar) erreicht werden, womit diese bisher einzigartig sind.^[55]

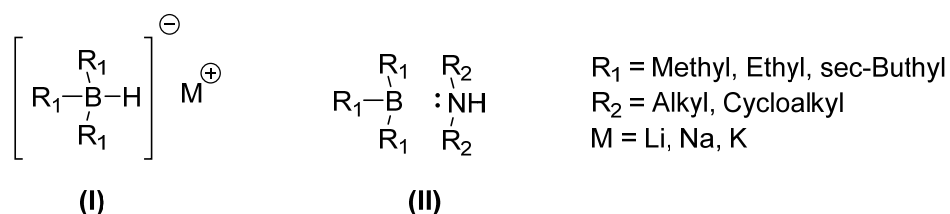


Abbildung 3. Boran-Reduktionsmittel, die in Kombination mit polyacrylatbasierten Klebstoffen eine starke Haftung auf Polyolefinen ermöglichen.^[55]

Trotz der genannten Fortschritte im Bereich der Klebstoffe für niedrigenergetische Polyolefinoberflächen sind umweltfreundliche, wasserbasierte Systeme weiterhin kaum realisiert und daher sehr gefragt. Die biologische Welt der Proteine und Peptide, welche durch die vielfältigen Aminosäuren verschiedenste Bindungseigenschaften ausbilden können, bietet hierbei einen interessanten Ansatz.

2.4 Peptidbasierte Adhäsive

Trotz ihres großen Potentials sind nur wenige Proteine bekannt, welche bereits als Klebstoffe Anwendung finden.^[56] Als Beispiel sind hier die als Kasein bezeichneten Molkeproteine zu nennen. Kasein ist ein seit Jahrtausenden bekannter Holzklebstoff und wird heutzutage außerdem für Etikettierungen eingesetzt.^[57] Das bei der Stärkeproduktion anfallende Weizengluten, welches einzigartige viskoelastische und kohäsive Eigenschaften aufweist, eignet sich nach Vorbehandlungen als Holzleim.^[58] Weiterhin gehört Gelatine, ein wasserlösliches und biokompatibles, aus Collagen gewonnenes Protein, zu den am umfangreichsten untersuchten Materialien für Wundklebstoffe.^[59]

Darüber hinaus sind aus der Natur vielfältige Klebsysteme bekannt, die unsere synthetischen Klebstoffe in ihren Eigenschaften oft bei weitem übertreffen.^[13] So verwenden Insektenfressende Pflanzen klebrigen Schleim zum Fangen ihrer Beute. Termiten bauen meterhohe Türme mit Hilfe ihres Speichels, der zusammen mit der Erde aushärtet. Glühwürmchen und Stummelfüßer fangen Beutetiere mittels klebriger Fäden. Muscheln und Seepocken sind in der Lage im Salzwasser unter schwierigsten Bedingungen auf verschiedensten Untergründen zu haften. Die Grundlage dieser natürlichen Klebstoffe bilden adhäsive Proteine, die je nach Spezies verschiedene Strukturen aufweisen. Seit Jahrzehnten versucht man daher diese natürlichen Systeme zu studieren, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen, wobei die Haftung der marinen Muschel am intensivsten untersucht wurde.^[60] Die für die extrem starke Haftung verantwortlichen Muschelfußproteine sind zum größten Teil aus der nicht-proteinogenen Aminosäure L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) sowie benachbarter basischer Aminosäuren, vor allem Lysin, aufgebaut.^[61] Die Catecholfunktion des L-Dopa ermöglicht eine starke Bindung an vielfältige Oberflächen über verschiedene Komplexbildungs- und Redoxmechanismen. Benachbarte Lysinseitenketten binden dabei Wassermoleküle aus der Hydratschicht der Oberfläche, sodass diese für die Bindung des L-Dopa frei verfügbar wird. Das Potential dieser einzigartigen Muschelproteine als Spezialklebstoffe bzw. Beschichtungen wurde bereits in der Medizintechnik demonstriert.^[62] Parallel nimmt die Forschung an anderen, bereits aufgeführten, natürlichen Haftsystemen wie Seepocken oder Stummelfüßern zu.^[63] Die Ursache dafür, dass Peptide und Proteine nicht heute schon umfangreich im Spezialklebstoff-Bereich eingesetzt werden, liegt vor allem in deren aufwendiger Herstellung. Am Beispiel der Muschel wird deutlich, dass die Extraktion der Proteine aus dem natürlichen Organismus aufgrund des hohen Aufwands und der niedrigen Ausbeuten keine Option darstellt. Für die Gewinnung nur eines Grammes der Muschelfußproteine sind etwa 10.000 Muscheln nötig.^[64] Die chemische Synthese stellt eine

Alternative dar und bietet zusätzlich die Möglichkeit Modifikationen vorzunehmen, kürzere Peptidfragmente herzustellen oder gänzlich neue Sequenzen zu erproben. Problematisch sind jedoch die immens hohen Kosten der chemischen Peptidsynthese bei der Herstellung in einem größeren Maßstab. Ein Kilogramm Peptid würde somit etwa eine Million Euro kosten; ein Preis der selbst für Spezialanwendungen deutlich zu hoch ist. Zur Methode der Wahl ist daher die rekombinante Synthese geworden, das heißt die Peptide bzw. Proteine werden von gentechnisch veränderten Mikroorganismen produziert und anschließend aufgereinigt. Auch hierbei gibt es vielfältige Probleme, beispielsweise werden die produzierten Peptide vom Wirtsorganismus teilweise direkt wieder abgebaut, schaden diesem oder verklumpen, was die Extraktion erschwert.^[65] Das Forschungsgebiet ist jedoch aufgrund des enormen Potentials von Innovation geprägt, wodurch sich viele Probleme bereits überwinden ließen. Als Beispiel sei hier das Unternehmen *Numaferm* aufgeführt, ein 2017 gegründetes, wachsendes und mehrfach preisgekröntes deutsches Biotech Start-Up. In dem von *Numaferm* patentierten Verfahren erlauben Peptidtags, den vereinfachten Transport der rekombinanten Peptide durch die Zellwand der Bakterien-Wirtszellen ins Medium.^[66] Somit lassen sich sehr viel höhere Ausbeuten und ein deutlich geringerer Aufwand bei der Aufreinigung erreichen. Vielfältige Peptidsequenzen lassen sich bereits über dieses innovative und umweltfreundliche Verfahren herstellen, was den Preis für ein Peptid aus 20 Aminosäuren im Kilogramm- bis Tonnen-Maßstab zukünftig auf etwa 1000 Euro/Kilogramm senken wird.^[67] Es ist zu erwarten, dass protein- und peptidbasierte Spezialklebstoffe mit der genannten Kostenreduktion bei der Synthese in naher Zukunft marktfähig werden. Auf diese Weise könnten natürliche Haftproteine wie die der Muschel, aber auch neuartige Peptide, dabei helfen, problematische Systeme zu kleben. Neuartige spezifisch bindende Peptide lassen sich auf verschiedenen Wegen generieren, welche im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

2.4.1 Selektion spezifisch bindender Peptide

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, um Peptidsequenzen mit starker Affinität für bestimmte Zielstrukturen zu erzeugen. Eine Variante stellt das rationale Design dar, welches meist *in silico*, das heißt durch computergestützte Simulationen, erfolgt.^[68] Diese Methode basiert zumeist auf der gezielten Erzeugung von Sekundärstrukturen (alpha-Helix, beta-Faltblatt). Entscheidend für den Erfolg ist ein gutes Verständnis der Sequenz-Struktur-Beziehung sowie der daraus resultierenden Funktion der Peptidsequenz. Für komplexe Systeme gestaltet sich dies ohne dramatische Vereinfachungen und Annahmen in den

Simulationen zunehmend schwierig. Kombinatorische Methoden sind hier eine sinnvolle Alternative. Beispielsweise ist es möglich über kombinatorische Festphasen-Peptidsynthesen, wie das „Split and Mix“-Verfahren harzbasierte Peptidbibliotheken zu erzeugen, die pro Harzkügelchen nur eine Peptidsequenz tragen.^[69] Dabei können bis zu 10^8 verschiedene Sequenzen bei einem Peptid aus nur sieben Aminosäuren erzeugt werden. Diese „one-bead-one-compound“ (OBOC) Bibliotheken lassen sich dann mit speziellen Assays auf Peptide mit den gewünschten Eigenschaften durchsuchen. Eine andere Möglichkeit sind Peptid-Arrays auf festen Trägermaterialien wie sie beispielsweise durch die SPOT-Synthese (Synthetic Peptide Arrays on Membrane Supports) ermöglicht werden. Dabei findet die Peptidsynthese im Nanomol-Maßstab *in situ* auf funktionalisierter Cellulose statt, sodass sich mehrere Hundert Peptide auf wenigen quadratzentimetergroßen Chips befinden.^[69]

Eine weitere Möglichkeit bieten biokombinatorische Methoden, die besonders häufig für die Identifizierung spezifisch bindender Peptide verwendet werden. Hierbei ist vor allem Phagendisplay zu nennen, welches die Grundlage dieser Arbeit bildet und im nächsten Kapitel genauer erläutert wird. Erwähnenswert ist aber auch die gerichtete Evolution, bei welcher Proteine und Enzyme *in vitro* über zufallsbasierte Mutagenese und anschließende Selektion und Auswahl verbesserter Mutanten optimiert werden.^[70] Meist wird die zufallsbasierte Mutagenese mittels biotechnologischer Polymerase-Kettenreaktionen (PCR), vor allem der error-prone-PCR durchgeführt. Schwaneberg zeigte, dass sich mittels gerichteter Evolution Peptide generieren lassen, die an niedrigenergetischen Kunststoffoberflächen wie Polypropylen oder Polystyrol binden.^[71] Dazu wurden antimikrobielle Peptide aus einer Datenbank ausgewählt, weil diese bereits von der Natur für die Bindung an Membranen optimiert wurden. Mittels eines fluoreszenzbasierten Screenings und Tensid-Waschschritten wurde das am stärksten bindende Peptid, eine Sequenz aus 47 Aminosäuren, ausgewählt.^[71a] Im nächsten Schritt wurden zufällige Genvarianten über error-prone-PCR erzeugt, wobei 20 Mutationen pro Kilobase angestrebt waren. Das nachfolgende Screening ergab verbesserte Sequenzen mit einer höheren Bindungsstärke auf Polypropylen.^[71b] Über KnowVolution (Knowledge Gaining Directed Evolution) wurde die Sequenz weiter optimiert, indem Schlüsselpositionen identifiziert, Aminosäuresubstitutionen ausgewählt und Substitutionen rekombiniert wurden. Eine bis zu 5,4-fache Verstärkung der PP-Bindung im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz konnte auf diese Weise erzielt werden (Tabelle 3). Interessant sind die Arten von Mutationen, die zu einer Bindungsverstärkung führen. So wurden vor allem die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure, sowie Tyrosin durch basische Aminosäuren substituiert. Die Einführung von Arginin führte dabei zur größten Bindungsverstärkung der Peptidsequenz auf Polypropylen.^[71c]

Tabelle 3. Von Schwaneberg et al. über KnowVolution zur Bindung auf PP durchgeführte Optimierungen der Peptidsequenz:

AIKLVQSPNGNFAASFVLDGTKWI²⁴FKSKY²⁹YD³¹SSKG³⁵YWVGIYE⁴²VWDRK.^[71c]

Variante	Mutierte Positionen	Verstärkung der Bindung
1	I24T, Y29H, E42K	3,4
2	D31V, E42G	2,5
3	Y29R, G35R	5,4

2.4.2 Phagendisplay

Bakteriophagen wurden bereits seit den 1970er Jahren zum Klonen und Sequenzieren von DNA Fragmenten verwendet. Der Biologe George P. Smith entdeckte Mitte der 1980er Jahre die Möglichkeit Phagen in „Bibliotheken“ genetischer Information umzuwandeln, wobei die codierten Polypeptide an der Phagenoberfläche präsentiert werden.^[7a] Dazu insertierte er ein DNA-Fragment eines bakteriellen Enzyms in die DNA eines Phagen, sodass Teile des Enzyms gemeinsam mit einem Hüllprotein des Phagen exprimiert wurden. Das Enzym befand sich nun an der Oberfläche der Phagen, welche mithilfe eines enzymespezifischen Antikörpers angereichert werden konnten. Interessant ist vor allem, dass diese genmodifizierten Phagen noch immer infektiös und damit in der Lage waren, ihre genetische Information weiterzugeben.^[7b] Einige Jahre später stellte Smith auf diese Weise die erste Phagenbibliothek her, in der nun zufällige Peptidsequenzen präsentiert wurden.^[72]

Für Phagenbibliotheken werden filamentöse Phagen, meist M13 oder die verwandten fd Phagen verwendet. M13 Bibliotheken sind am weitesten verbreitet, da sie kommerziell erhältlich sind. Der flexible und stabförmige Virenkörper ist 930 nm lang, hat einen Durchmesser von 6,5 nm und besteht aus einer Proteinhülle mit fünf Hüllproteinen, die die

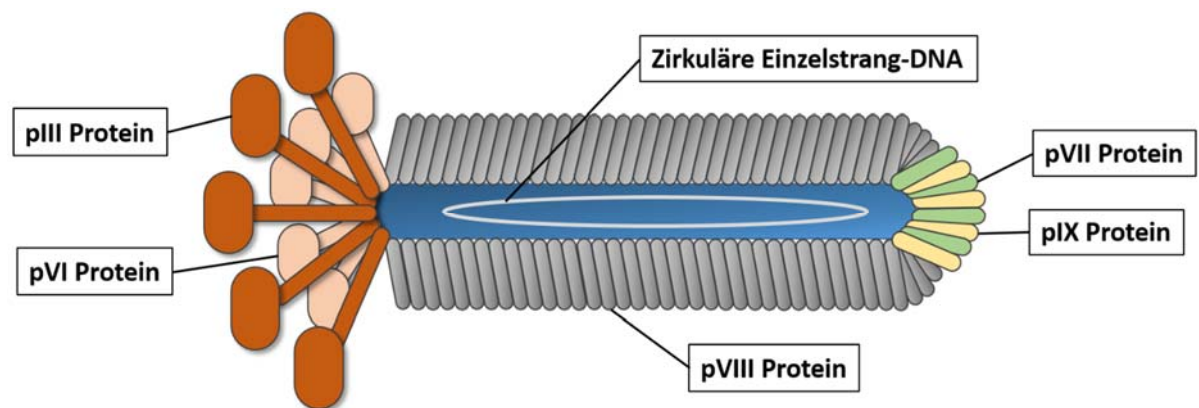


Abbildung 4. Schematischer Aufbau eines M13 Phagen bestehend aus fünf Hüllproteinen, welche die virale DNA umschließen. In kommerziellen Phagenbibliotheken werden die randomisierten Peptidsequenzen am N-terminalen Ende des pIII-Proteins exprimiert.

virale zirkuläre Einzelstrang-DNA umschließt (Abbildung 4). Dabei entfällt der größte Anteil auf 2700 Kopien des Hüllproteins pVIII, welches den Phagenkörper bildet. Die beiden Enden setzen sich aus jeweils fünf Kopien der Hüllproteine pIII und pVI sowie pVII und pIX zusammen. Typischerweise wird die zufällige Peptidsequenz an jeder der fünf Kopien des pIII-Proteins exprimiert, wobei pIII auch für die Bindung des Phagen an den f pilus der *E. coli* und damit die Initiierung der Infektion des Bakteriums zuständig ist. Um die Amplifizierung der Phagen nicht vollständig zu hemmen, ist die maximale Länge des Peptids limitiert.^[73]

Eine kommerziell erhältliche Phagenbibliothek präsentiert $10^8 - 10^{11}$ verschiedene Peptidsequenzen, ist preiswert und simpel zu handhaben und zu amplifizieren. Das Affinitätsscreening, auch Biopanning, besteht aus vier Schritten: (1) Inkubation der Phagenbibliothek mit dem Target; (2) Waschschritte zum Entfernen der nicht-gebundenen Phagen; (3) Elution der Target-bindenden Phagen; (4) Amplifizierung der bindenden Phagen in *E. coli* (Abbildung 5). Diese vier Schritte können zwei bis fünfmal wiederholt werden, um Phagen mit hoher Affinität für das Target anzureichern. Die Phagen halten dabei harschen Bedingungen wie hohen Salzkonzentrationen oder einem sehr niedrigen pH-Wert stand.^[7c]

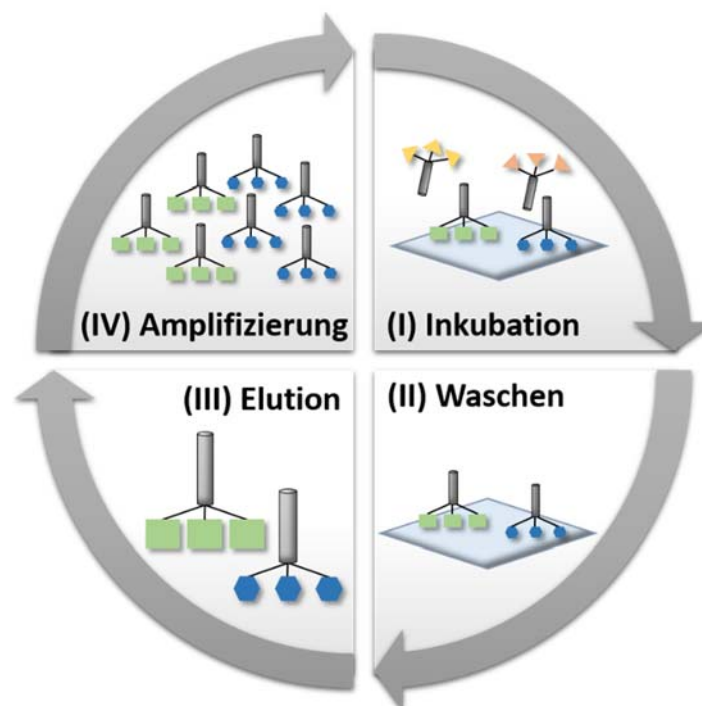


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Biopannings eines Phagendisplay-Experiments. **(I)** Zunächst wird das Target mit der Phagenbibliothek inkubiert. Je nach präsentierter Peptidsequenz am pIII-Protein weisen die Phagenklone unterschiedliche Affinitäten für das Target auf. **(II)** In mehreren Waschschritten werden nicht-bindende Phagen von der Oberfläche entfernt. **(III)** Anschließend werden die bindenden Phagen, zum Beispiel durch enzymatischen Verdau, vom Target eluiert. **(IV)** Die Amplifizierung der eluierten Phagen erfolgt in einer *E. coli*-Kultur. Bindende Phagenklone können über mehrere Biopanning-Zyklen angereichert werden.

Die Elution der Phagen vom Target kann über die Absenkung des pH-Werts oder Trypsin-Verdau geschehen. Nach der Amplifizierung werden die Aminosäuresequenzen der Peptide, welche für die Bindung an das Target verantwortlich sind, durch Ermitteln der entsprechenden codierenden Sequenz in der viralen DNA bestimmt.

Die Sequenzvielfalt der Phagenbibliothek wird auf der DNA-Ebene bestimmt.^[74] Beispielsweise werden für kommerziell erhältliche Bibliotheken nur NNK Codons eingesetzt (N = jede Nukleobase, K = Guanin oder Thymin), wodurch weiterhin alle zwanzig Aminosäuren ermöglicht werden, aber die Stopcodons minimiert werden. Bestimmte Aminosäuren wie Serin, Leucin und Arginin werden überrepräsentiert, weil sie durch drei verschiedene Codons codiert werden. Zusätzlich werden die Sequenzen in *E. coli* mit leicht unterschiedlicher Geschwindigkeit amplifiziert, was am Ende der Amplifizierung zu starken Anreicherungen bestimmter Sequenzen führen kann. Beispielsweise werden die Aminosäuren Cystein, Arginin und Glycin unterdrückt während Prolin, Threonin und Histidin angereichert werden. Zurückführen lassen sich diese Effekte auf Präferenzen für die genetische Cododegenerierung sowie die Signalpeptidase-Spaltung. Dies führt zu einem mit der Target-Bindung konkurrierenden Selektionsdruck und beschränkt die Anzahl der möglichen Panning-Runden.^[74]

Phagendisplay wurde seit seiner Erfindung auf vielfältige Targets erfolgreich angewendet. Für diese Entdeckung wurde George P. Smith im Jahr 2018 zusammen mit Gregory P. Winter, der die Methode später weiterentwickelte, mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Die Anwendungen des Phagendisplays liegen vor allem in der Selektion von Bindern biologischer Targets wie Proteine oder Antikörper. Beispielsweise kann Epitopkartierung, das heißt die Bestimmung von Bindungssequenzen auf Antikörpern über Phagendisplay geschehen.^[75] Auch im Bereich der Wirkstoffforschung führten bereits viele Peptide, die mittels Phagendisplay identifiziert wurden zu neuen Medikamenten.^[76]

Daneben wurde Phagendisplay auch im Bereich der Materialwissenschaften für die Selektion bindender Peptide für verschiedenste Oberflächen verwendet. Dazu gehören anorganische Materialien wie Metalle^[77], halbleitende Metalloxide^[78], Nanopartikel^[79] und auch organische Materialien^[11], zum Beispiel die synthetischen Polymere Polystyrol^[80] und PMMA^[81] sowie natürliche Polymere wie Chitin^[82] und Cellulose^[83]. Darüber hinaus hat die Firma DuPont de Nemours, Inc. ein Phagendisplay-Screening an einer Reihe von Polymeren, darunter auch PE und PP, durchgeführt und die erhaltenen Peptidsequenzen patentiert.^[84] Dies ist das bisher einzige literaturbekannte Phagendisplay-Experiment mit den niedrigenergetischen Polyolefinen PE und PP.

2.5 Sanger-DNA-Sequenzierung

Nach einem Phagendisplay-Experiment werden die bindenden Peptidsequenzen über die Sequenzierung der DNA bestimmt. Dies geschieht in der Regel durch die sogenannte Sanger-Sequenzierung, benannt nach Frederik Sanger, welcher die Methode 1975 erstmals beschrieb.^[8] Für seine Arbeiten zur DNA-Sequenzierung erhielt Sanger zusammen mit Walter Gilbert und Paul Berg 1980 den Nobelpreis für Chemie. Die auf Kettenabbrüchen basierende Sequenziermethode benötigt ein Einzelstrang-DNA-Templat, DNA-Primer, DNA-Polymerase sowie normale und modifizierte Nukleotidtriphosphate.

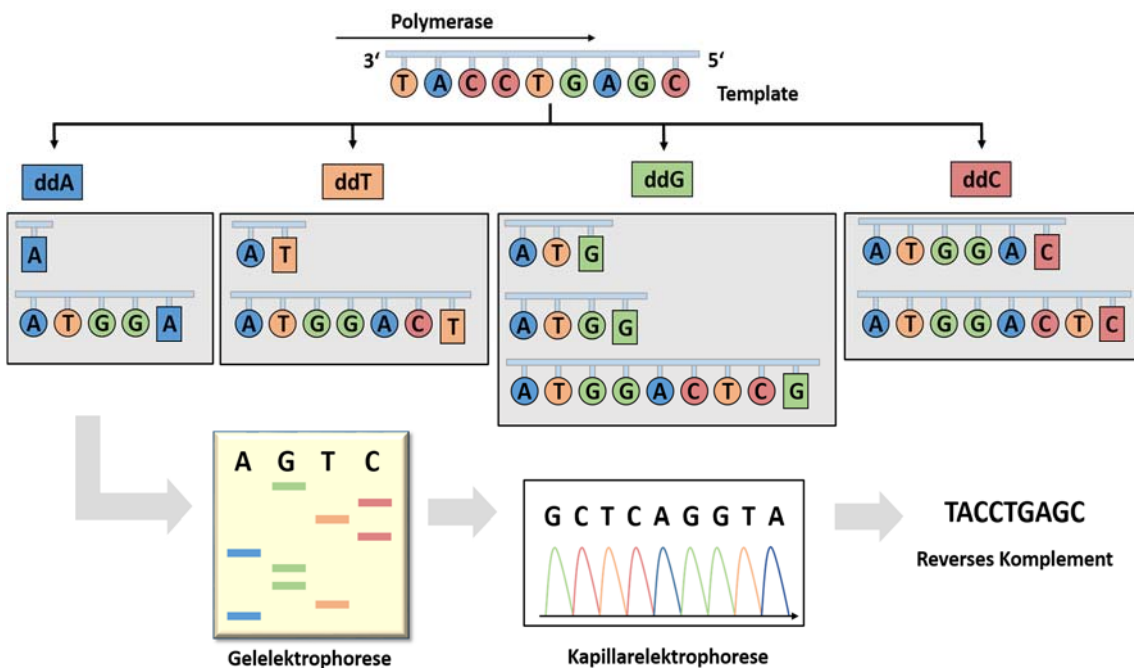


Abbildung 6. Prinzip der DNA-Sequenzierung nach Sanger. Die DNA-Polymerase bildet den komplementären Strang bis es zum Kettenabbruch durch den Einbau eines Dedesoxynukleotidtriphosphates (ddNTP) kommt. Die entstehenden Fragmente können mittels Gel- oder Kapillarelektrophorese analysiert werden.

Im Vergleich zu normalen Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) fehlt den modifizierten Dedesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) die 3'OH-Gruppe am Ribosering, wodurch es nach dem Einbau eines solchen Nukleotids zum Abbruch der DNA-Synthese kommt. Die ddNTPs wurden radioaktiv, später durch Fluoreszenzfarbstoffe, markiert, um die Detektion zu ermöglichen. Die DNA-Probe wird auf vier Reaktionsgefäße verteilt, wobei jeweils alle vier dNTPs aber nur eine der vier ddNTPs enthalten sind (Abbildung 6). Nun synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären Strang bis es zum Abbruch nach Einbau eines ddNTPs kommt. Als Resultat werden Fragmente verschiedener Länge erhalten und mittels Gelelektrophorese getrennt, wodurch sich die komplementäre DNA-Sequenz ergibt. Bereits 1987 konnten automatisierte, fluoreszenzbasierte Sanger-Sequenziermaschinen 1000 Basen

pro Tag generieren.^[85] Weitere Verbesserungen stellte die Einführung der Kapillarelektrophorese sowie die Markierung der ddNTPs mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen dar, wodurch nur noch ein Reaktionsgefäß benötigt wurde.^[86] Zu den großen Erfolgen der Sanger-Sequenzierung zählt der Abschluss des 14 Jahre laufenden Human Genom Projekts mit der Publizierung des kompletten menschlichen Genoms bestehend aus 2,85 Milliarden Nukleobasen im Jahr 2004.^[87]

2.6 Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde die Sanger-Sequenzierung fast vollständig von Hochdurchsatz-Sequenziermethoden abgelöst. Diese, unter dem Begriff Next-Generation Sequencing (NGS) zusammengefassten Methoden beruhen auf der Immobilisierung der DNA sowie multiplexer Detektion, womit eine enorme Anzahl paralleler Sequenzierungen möglich wurde.^[86] Im Jahr 2005 wurde das erste kommerzielle NGS-Gerät des Herstellers *454* auf den Markt gebracht, gefolgt von *Illumina*, *Ion Torrent* und weiteren. Die zugrunde liegenden Mechanismen bilden Pyrosequencing (Roche/454), Sequencing-by-Synthesis (Illumina), Sequencing-by-Ligation (Applied Biosystems), sowie Ion-Semiconductor sequencing (Ion Torrent).^[9a]

Nach einigen Jahren des Wettbewerbs wird der Markt heute von Illumina-Sequenziergeräten dominiert. Durch die NGS-Technik sanken die Kosten der DNA-Sequenzierung am Beispiel der Sequenzierung des Humanen Genoms im Zeitraum von 2001 bis 2017 von 100 Millionen US-Dollar auf 1000 US-Dollar.^[9b] Die Read-Längen der NGS-Methoden liegen, wenn auch noch niedriger als bei der Sanger-Sequenzierung, bereits im Bereich von wenigen Hundert Basen, und weisen eine Genauigkeit von bis zu 99,9% auf. Heute können mit einem Illumina-Gerät 23 Gigabasen an einem einzigen Tag sequenziert werden, was die Datenmenge des 14 Jahre dauernden Human-Genom-Projekts um Faktor 40 übersteigt. Im Folgenden soll der Illumina-Sequenziermechanismus näher beschrieben werden, da alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phagenbibliotheken auf diese Weise sequenziert wurden.

2.6.1 Illumina-Sequenzierung

Im Vergleich zur Sanger-Methode wird bei der Illumina-Sequenzierung anstelle der Bestimmung der DNA-Fragment-Länge, direkt während der Synthese des komplementären Stranges der Einbau der verschiedenen Nukleotide detektiert. Dies beruht auf dem Prinzip Sequencing-by-Synthesis und setzt eine spezielle Probenvorbereitung voraus.^[9c] Diese

umfasst Fragmentierung (optional, aber notwendig bei Genom-DNA), Adapter-Ligation, Amplifizierung (bei geringen Mengen) und einen Qualitätscheck der erhaltenen Bibliothek (qPCR, fluorimetrische Methoden, Kapillarelektrophorese). Die Adapter-Ligation ist nötig, um an beiden Enden des DNA-Templates Sequenzen einzuführen, welche als Primer für die DNA-Polymerase dienen und die Bindung an die Oligonukleotide der Flow-Zellen-Oberfläche ermöglichen (Abbildung 7). Nach erfolgreicher Probenvorbereitung findet die Cluster-Generierung in einer Flow-Zelle statt, welche einfaches Zuführen sowie Waschen von Reagenzien erlaubt. Die DNA-Fragmente binden an die Oberfläche der Flow-Zelle und werden im nächsten Schritt über ‚Bridge-Amplification‘ vervielfältigt, sodass Cluster gleicher DNA-Fragmente entstehen. Die reversen Stränge werden abgespalten und abgewaschen, wodurch die Cluster nur noch aus Vorwärts-Strängen bestehen.

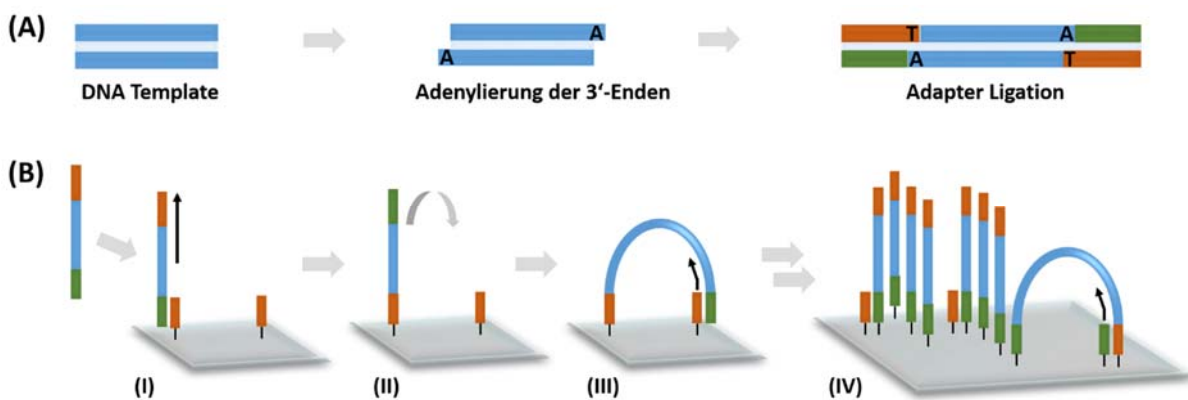


Abbildung 7. (A) Probenvorbereitung für Illumina-Sequenzierung. Mittels Adapter-Ligation werden DNA-Abschnitte für die Bindung an die Oligo-Sequenzen in der Flow-Zelle eingefügt. **(B)** Die Cluster-Generierung in der Flow-Zelle geschieht über „Bridge-Amplification“. Dabei bindet das DNA-Template über die ligierten Abschnitte an die Flow-Zellen-Oligos **(I)**. DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären Strang **(II)**, welcher anschließend verbrückend an den zweiten Oligotyp bindet und auf diese Weise amplifiziert wird **(III)**. Es entstehen 100-200 Millionen Cluster, die jeweils aus Klonen eines Templates bestehen.^[9a]

Anschließend werden Primer und fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die durch eine abspaltbare 3'-O-Azidomethyl-Gruppe modifiziert sind, zugeführt (Abbildung 8). Die DNA-Polymerase bindet an den Primer und fügt das erste neue Nukleotid in den entstehenden komplementären Strang ein. Nach dem Einbau eines Nukleotids können keine weiteren eingebaut werden bis die 3'-O-Azidomethyl-Funktionalität abgespalten wird. Nun aktiviert ein Laser die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe und die emittierten Signale aller Cluster werden gleichzeitig von einer Kamera detektiert. Jedes der Nukleotide emittiert dabei eine andere Farbe. Nach der Detektion erfolgt die Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes und der 3'-O-Azidomethyl-Gruppe und der Einbau des nächsten Nukleotids kann beginnen. Die Auswertung der enormen Datenmenge ist ein essentieller Schritt am Ende der Sequenzierung. Für die

Hauptanwendung der Genom-Sequenzierung müssen die einzelnen DNA-Fragmente zur gesuchten Ziel-DNA zusammengesetzt werden. Im Fall einer Phagenbibliothek ist dieser Schritt allerdings überflüssig, da keine Fragmentierung stattfand und jeder erhaltene DNA-Read einem Phagen entspricht.

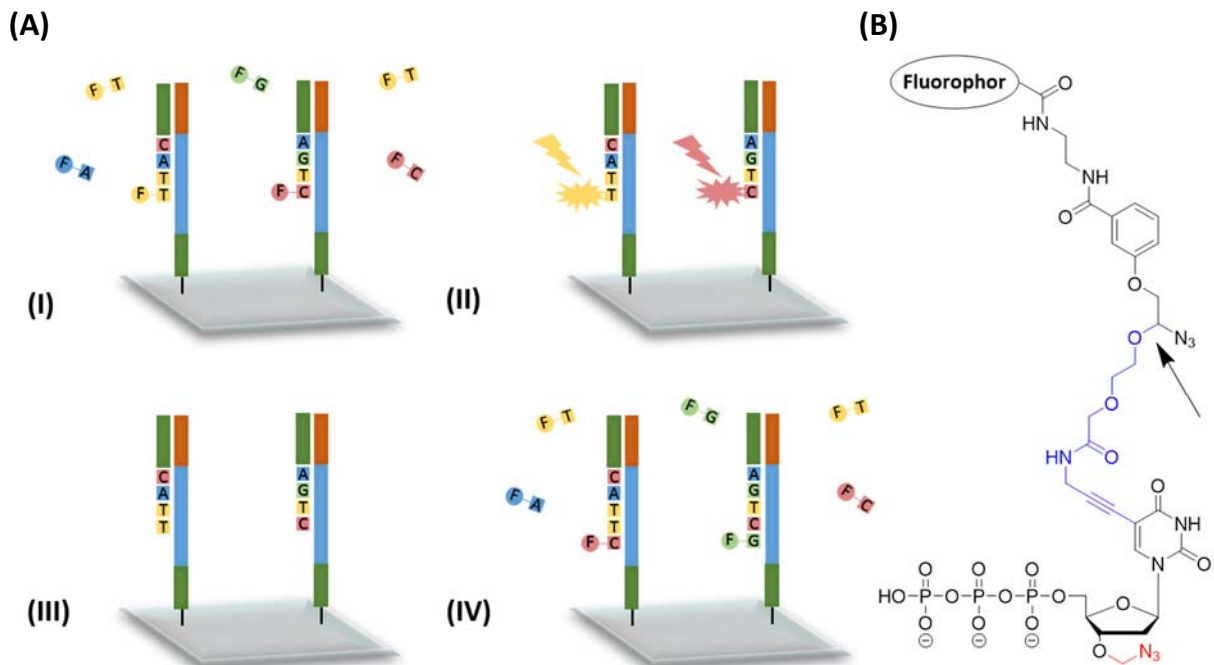


Abbildung 8. (A) Schematische Darstellung der Illumina-Sequenzierung. (I) DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären Strang aus allen vier Nukleotiden, wobei jedes der Nukleotide einen anderen Fluoreszenzfarbstoff trägt. (II) Nach dem Einbau eines Nukleotids unterbricht die Synthese. Ein Waschschritt entfernt die überschüssigen Nukleotide und über Anregung mit Hilfe eines Lasers wird das Fluoreszenzsignal aller Cluster gleichzeitig detektiert. (III) Die reversible 3'OH-Funktion sowie der Fluoreszenzfarbstoff werden abgespalten und die nächste Nukleobase kann eingebaut werden. (IV) (B) Molekülstruktur eines modifizierten Nukleotids für die Illumina-Sequenzierung. Der Pfeil deutet auf die Bindung hin, an welcher der Farbstoff abgespalten wird. Der blaue Teil des Moleküls verbleibt in der neu-synthetisierten DNA. In Rot ist die abspaltbare 3'-O-Azidomethyl-Gruppe dargestellt, welche die weitere Synthese inhibiert.^[9a]

Ein Nachteil der Illumina-Technologie ist die relativ hohe Fehlerrate während der Sequenzierung.^[88] Die Anzahl der Fehler steigt mit jedem Zyklus während der Synthese, wodurch die maximale Read-Länge limitiert wird. Eine Hauptursache für Fehler liegt in der Detektion der Fluoreszenzsignale, welche durch Filter getrennt werden. Die Fluorophore der Basen Adenin und Cytosin werden durch einen roten Laser angeregt, während für Guanin und Thymin ein grüner Laser verwendet wird. Aufgrund der ähnlichen Emissionsspektren liegt eine starke Korrelation zwischen A und C sowie G und T vor. Ein weiterer Fehler-verursachender Effekt ist das „Phasing“ bzw. „Pre-phasing“. Dies bedeutet, dass einige Moleküle eines Clusters in der Synthese zurückliegen bzw. weiter fortgeschritten sind, infolgedessen sich verschiedene

Fluoreszenzsignale in einem Cluster überlagern. Darüber hinaus gibt es verschiedene Sequenz-Muster, welche Fehler verursachen können. Dazu gehören zum einen Wiederholungen invertierter Abschnitte, welche Loops in der DNA verursachen und damit die Polymerase behindern und zum anderen GGC-Abschnitte, welche in Verdacht stehen die Enzymaktivität zu beeinflussen. Zur bestmöglichen Vermeidung der genannten Fehler wird das sogenannte „Paired end reading“ angewendet. Dabei dient der neu-synthetisierte DNA-Strang als Vorlage für einen zweiten Sequenzierprozess. Auf diese Weise können sequenzspezifische Fehler ausgeglichen werden, da für den zweiten Read der revers-komplementäre Strang sequenziert wird.

2.6.2 Phagendisplay und Next-Generation-Sequenzierung

Während NGS im Bereich der Gesamt-Genom-Sequenzierung bereits die Standardmethode darstellt, wird für Phagendisplay-Experimente noch weitestgehend die Sanger-Sequenzierung verwendet. Dies erfordert das Picken und Amplifizieren einzelner Klone von Agarplatten, sowie deren getrennte DNA-Extraktion und Sequenzierung. Durch den relativ hohen Arbeitsaufwand liegt die Zahl der sequenzierten Phagen typischerweise im Bereich von 20 – 100 Klonen. Das bedeutet, dass aus der etwa 10^7 Sequenzen umfassenden Bibliothek nur ein winziger Bruchteil analysiert werden kann. Die hohe Anzahl an DNA-Reads, welche die NGS-Methoden liefern (meist $>10^6$), ist daher sehr gut zur Analyse des Phagendisplays geeignet. Darüber hinaus ermöglicht die Sequenzierung einer großen Zahl an Phagen deutlich genauere Aussagen zur Diversität, Anreicherung bestimmter Sequenzen und zu Bindungsmotiven.

Im Jahr 2009 kombinierten Dias-Neto et al. erstmals Phagendisplay mit NGS, genauer mit Pyrosequencing, und erreichten auf diese Weise eine signifikante Kosten- und Zeitreduktion (250x günstiger und 1000x schneller pro Sequenz).^[89] Ein Jahr später, beschrieben Ravn et al. Illumina-Sequenzierung von selbst designten Antikörper-Phagenbibliotheken. Hierbei wurden bindende Sequenzen *in silico* identifiziert, wobei auch solche Sequenzen gefunden wurden, die mit dem klassischen Screening verfehlt wurden.^[10b] Später demonstrierten t’Hoen et al., dass die Kombination aus Phagendisplay und Illumina-Sequenzierung bereits nach nur einer Panning-Runde starke Binder hervorbringt.^[10a] Dabei wurde eine kommerzielle Ph.D.-7 M13-Bibliothek gegen osteoblastische Zellen selektiert. Zusätzlich wurden erstmals naive Bibliotheken sequenziert, das bedeutet Phagen-Bibliotheken, welche nicht mit dem Target in Berührung kamen und als Referenz zur Eliminierung falsch-positiver Treffer dienen. Lebendzell-Imaging zeigte anschließend eine starke Bindung sowie eine hohe Aufnahme der selektierten Peptidbinder in den Zellen. Rebollo et al. sequenzierten Phagen-Bibliotheken, die

gegen fünf verschiedene Protein-Targets isoliert wurden. Nach der Anwendung verschiedener Qualitätsfilter und Korrekturalgorithmen für fehlerhafte Sequenzen konnten gemeinsame Bindungsmotive identifiziert werden.^[90] Liu et al. entdeckten Peptidbinder für Makrophagenzellen durch Kombination von Phagendisplay und Illumina-Sequenzierung und die Verwendung des MEME-Algorithmus für die Motivsuche (Multiple Em for Motif Elicitation).^[10c, 91]

Derda und Matochko untersuchten die Fehleranfälligkeit von Next-Generation-Phagendisplay anhand einer Ph.D.-7 Bibliothek, die über Illumina sequenziert wurde. Bestimmte Sequenzen wurden dabei identifiziert, welche trotz einer Anreicherung im Biopanning nach der Illumina-Sequenzierung in den NGS-Daten stark unterrepräsentiert sind. Es wird vermutet, dass diese Sequenzen bestimmte Eigenschaften aufweisen, die die Sequenzierung stören, auch wenn keine gemeinsamen Motive auftraten.^[92] Im Folgenden wurden in einer sehr umfangreichen Studie Amplifizierungspräferenzen der Phagen in Bakterien untersucht.^[93] Hierbei wurden sowohl die kommerziellen Ph.D.-7 als auch Ph.D.-12 M13-Bibliotheken mittels Illumina sowie Ion Torrent sequenziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Diversität der Bibliothek nach jeder Amplifizierung aufgrund einiger schnell wachsender ‚Parasiten‘-Sequenzen stark abnimmt. Meist sind es diese Sequenzen, die in herkömmlichen Phagendisplay-Experimenten identifiziert werden. Von 770 als Parasiten identifizierten 7-mer Sequenzen, waren bereits 197 in Studien publiziert, welche die Ph.D.-7 Bibliothek für unterschiedlichste Targets nutzten. Folglich unterliegt ein Phagendisplay-Experiment zwei verschiedenen Selektionsdrücken: (I) Bindung an das Target sowie (II) Amplifizierung in *E. coli*. Ein Ansatz zur Überwindung dieses Problems ist die Emulsions-Amplifizierung in einem mikrofluidischen System.^[94] Eine gleichmäßige Amplifizierung der Phagen kann erreicht werden, indem einzelne Phagenklone in isolierte Tropfen mit identischem Volumen eingeschlossen werden. Jeder Tropfen enthält somit nur einen Phagenklon sowie das Nährmedium und einen Überschuss an *E. coli*. Mit dieser Methode kann jedoch nicht die bereits bestehende verzerrte Diversität in der Ursprungsphagenbibliothek behoben werden, für dessen Herstellung ebenfalls *E. coli* verwendet werden.

Für die Sequenzierung von Phagenbibliotheken finden NGS-Methoden zunehmend Anwendung, jedoch beschränkt sich dies bisher auf biologische Targets wie Zellen oder Proteine. Bislang ist keine Kombination dieser beiden Methoden für materialwissenschaftliche Anwendungen bekannt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Auswahl und Charakterisierung der PP-Oberflächen

Die Entwicklung von wasserbasierten Haftsystemen für niedrigerenergetische Polymeroberflächen ist, wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, von besonderer Relevanz. In einer Kooperation mit dem Klebstoffhersteller Henkel wurden Polyolefin-Folien erhalten, welche zum einen bereits kommerzielle Produkte darstellen und zum anderen, die für Polyolefine typischen Probleme bezüglich der Haftung aufweisen. Folien besitzen dabei den Vorteil der einfachen Handhabbarkeit. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde eine PP-Folie mit einer Dicke von 50 μm ausgewählt, welche eine unbehandelte Seite (PP_{unb}) und eine Corona-behandelte Seite (PP_{cor}) aufweist. Auf diese Weise können beide Seiten vergleichend bezüglich des Haftverhaltens untersucht werden. Es handelt sich um ein coextruiertes PP-Homo- und Copolymer. Dies bedeutet, dass zusätzlich ein geringer Anteil an Ethyleinheiten vorliegt. Die Anwendungsbereiche der Folie liegen im Bereich von Laminaten und Verpackungen, wobei sie auch für Lebensmittel zugelassen ist.

Für eine erste Charakterisierung der Folienoberfläche, insbesondere in Hinblick auf die verschiedenen Seiten wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Der Kontaktwinkel mit Wasser ist dabei umso größer, je hydrophober die Oberfläche ist. Um zusätzlich zu untersuchen, inwieweit der Coroneffekt reversibel ist, wurde die Messung nach vier Monaten mit einer PP-Folie der gleichen Charge wiederholt. Erwartungsgemäß wurde auf der unbehandelten Folienseite ein größerer Kontaktwinkel (95° bzw. 99°) als auf der Corona-behandelten Seite (83° bzw. 79°) gemessen (Tabelle 4). Dies ist, wie in Kapitel 2.3.1 erläutert, auf die Einführung polarer Gruppen durch die Corona-Behandlung zurückzuführen, welche die Hydrophobie und somit die Benetzbarkeit der Oberfläche erhöhen.

Tabelle 4. Kontaktwinkel der PP-Folie mit Wasser in zeitlichem Abstand gemessen.

PP-Folie	08/2016	12/2016
Unbehandelt	$95^\circ \pm 3^\circ$	$99^\circ \pm 2^\circ$
Corona-behandelt	$83^\circ \pm 2^\circ$	$79^\circ \pm 2^\circ$

Des Weiteren kann die freie Oberflächenenergie eines Festkörpers über den Kontaktwinkel der Oberfläche mit mindestens zwei Flüssigkeiten berechnet werden. Ein Standardmodell für die Berechnung ist die Methode nach Owens, Wendt, Rabe und Kaelbe (OWRK)^[95], welche die freie Oberflächenenergie zusätzlich in einen polaren und einen dispersiven Anteil aufspaltet. Polare Wechselwirkungen sind Coulomb-Wechselwirkungen zwischen permanenten Dipolen oder zwischen permanenten und induzierten Dipolen, wie beispielsweise

Wasserstoffbrückenbindungen. Demgegenüber setzt sich der dispersive Anteil aus Wechselwirkungen zusammen, welche aufgrund zeitlicher Schwankungen in der Ladungsverteilung der Atome oder Moleküle entstehen, wie z. B. Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Als zweite Flüssigkeit wurde Diiodmethan verwendet, da dieses unpolar ist, aber dennoch gut messbare Kontaktwinkel ausbildet. Die freie Oberflächenenergie der unbehandelten PP-Folie beträgt 27 bzw. 28 mN/m und liegt damit nahe den in Kapitel 2.3 beschriebenen literaturbekannten Werten für PP und PE von 30 mN/m (Tabelle 5).^[36] Dominierend ist mit 26 mN/m der dispersive Anteil der Oberflächenenergie, da reines PP mangels polarer Gruppen vorrangig disperse Wechselwirkungen ausbildet. Die Corona-behandelte PP-Folie weist mit 37 mN/m eine höhere freie Oberflächenenergie und auch einen höheren polaren Anteil von 4 bzw. 6 mN/m auf. Dies stimmt mit früheren Studien zu PP überein, in welchen eine Erhöhung der PP-Oberflächenenergie durch Corona-Behandlung auf 35 mN/m^[96] bis 40 mN/m^[97] gemessen wurde.

Tabelle 5. Oberflächenenergien der PP-Folie berechnet nach dem OWRK-Modell aus den Kontaktwinkeln mit Wasser und Diiodmethan im zeitlichen Abstand bestimmt.

		08/2016	12/2016
PP-Folie unbehandelt	Freie Oberflächenenergie [mN/m]	27,9 ± 0,4	27,2 ± 0,6
	Dispersiv [mN/m]	26,1 ± 0,3	26,1 ± 0,4
	Polar [mN/m]	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
PP-Folie Corona- behandelt	Freie Oberflächenenergie [mN/m]	36,7 ± 0,1	36,8 ± 1,1
	Dispersiv [mN/m]	32,6 ± 0,1	31,0 ± 0,6
	Polar [mN/m]	4,0 ± 0,1	5,8 ± 0,6

Die in der Literatur beschriebene Reversibilität der Corona-Behandlung beruht auf zwei entropiegetriebenen Effekten, welche die Oberflächenenergie senken. Hydrophile Funktionalitäten reorientieren sich und diffundieren von der Oberfläche in das Innere des Polymers. Parallel diffundieren niedermolekulare Verbindungen, wie Additive oder Oligomere, an die Oberfläche. Die Abnahme der freien Oberflächenenergie wurde für PP mit 0,02 mN/m/Tag bestimmt.^[96] Für die in dieser Arbeit untersuchte PP-Folie kann dieser Effekt nach vier Monaten nicht beobachtet werden. Die freie Oberflächenenergie blieb unverändert und zusätzlich wurde für die Corona-behandelte Seite ein geringfügig höherer polarer Anteil berechnet. Bezüglich des Kontaktwinkels ist nach vier Monaten ebenfalls keine signifikante Änderung festzustellen (Tabelle 4). Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf die weitestgehend luftdichte, trockene und dunkle Lagerung der Folie auf einer Rolle, wobei für eine neue Probe jeweils einige Meter Folie verworfen wurden. Folglich ist für die Dauer der

Phagendisplay-Experimente keine signifikante Änderung der freien Oberflächenenergie der PP-Folie zu erwarten, die das Screening beeinflussen würde.

Eine weitere Methode, welche sich für die Oberflächenanalytik eignet, ist die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS). Röntgenstrahlen erzeugen Photoelektronen an der Oberfläche des untersuchten Materials, die für jedes Element eine charakteristische Energie aufweisen. Eine qualitative sowie quantitative Aussage über die Elementarzusammensetzung eines Festkörpers ist damit möglich, wobei die Informationstiefe drei bis fünf Nanometer beträgt. Die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse der XPS-Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Korinna Altmann aus dem Arbeitskreis von Dr.-Ing. Pedro Dolabella Portella an der Bundesanstalt für Materialforschung erhalten. In einer ersten Messung wurde die Elementarzusammensetzung beider Seiten der PP-Folie bestimmt. Zusätzlich wurde eine Folie aus rein isotaktischem PP (durchschn. $M_w = 250.000 \text{ g/mol}$, $M_n = 67.000 \text{ g/mol}$) unter Hitze und Druck in einer Polymerpresse hergestellt und untersucht (PP_{iso}). Alle Folien wurden jeweils gereinigt und ungereinigt gemessen, um den Effekt der Waschschritte zu beurteilen. Zu beachten ist dabei, dass Wasserstoff aufgrund des geringen Wirkungsquerschnittes nicht nachgewiesen werden kann.

Wie für PP zu erwarten, ist der Kohlenstoffanteil mit 89,5 – 98,5% für alle Folien am höchsten (Tabelle 6). Weiterhin wurde mit 3,0% deutlich mehr Sauerstoff auf der Corona-behandelten Folie als auf der unbehandelten Folie (1,5%) nachgewiesen, was sich auf Oxidationsreaktionen während der Corona-Behandlung zurückführen lässt. Stickstoff, welcher in Form von Amiden oder Aminen vorliegen kann, ist nur auf der ungereinigten Folie nachzuweisen. Die Waschschritte mit unpolarem Cyclohexan, sowie Ethanol und Reinstwasser reduzieren den Sauerstoffanteil und entfernen die stickstoffhaltigen Verbindungen vollständig von der Oberfläche. Gleichzeitig sind nach dem Waschen Spuren von Calcium und Aluminium nachweisbar, was durch Verunreinigungen in den verwendeten Lösungsmitteln verursacht werden kann. Diese wurden für alle weiteren Experimenten durch einen zusätzlichen Waschschritt mit hochreinem Isopropanol beseitigt. Die gepresste Folie aus isotaktischem PP zeigt trotz der hohen Reinheit des Ausgangsmaterials die stärksten Verunreinigungen, welche sich auch durch die Waschschritte nicht entfernen lassen. Dies ist möglicherweise durch die separate Herstellung der Folienstücke bei ca. 170 °C zu erklären, welche Oxidationsprozesse ermöglicht und nicht hinreichend reproduzierbar ist. Weitere Elemente wie Titan, Phosphor oder Chlor, welche in Katalysatoren oder Additiven vorkommen, konnten auf keiner der Folien nachgewiesen werden.

Tabelle 6. Über Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) bestimmter Anteil verschiedener Elemente auf den Oberflächen der PP-Folien. Bedingungen: Messungen wurden unter Verwendung einer Al-K-Röntgenquelle (1486,68 eV; 400 µm Probengröße) durchgeführt. Wasserstoff kann nicht bestimmt werden. Die Reinigung der Folie erfolgte durch jeweils eine Minute Waschen in Cyclohexan, Ethanol und Wasser.

	C 1s (at%)	O 1s (at%)	N 1s (at%)	Ca 2p (at%)	Si 2p (at%)	Al 2p (at%)
PP-Folie - Unbehandelt (gereinigt)	98,5	1,5	-	<0,1	-	<0,1
PP-Folie - Unbehandelt (nicht gereinigt)	93,5	3,6	2,9	-	-	-
PP-Folie – Corona-behandelt (gereinigt)	97,0	3,0	-	<0,1	-	<0,1
PP-Folie – Corona-behandelt (nicht gereinigt)	93,8	4,8	1,3	-	-	-
PP_{iso} (gereinigt)	89,5	7,0	1,4	0,4	1,1	0,7
PP_{iso} (nicht gereinigt)	92,2	4,4	0,8	0,3	1,1	1,1

Auffallend ist, dass auch die unbehandelte PP-Folie Sauerstoff an der Oberfläche aufweist. Im Folgenden wurden winkelabhängige XPS-Messungen in Kooperation mit Dr. Johannes Schmidt aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Arne Thomas an der Technischen Universität Berlin durchgeführt, um ein Tiefenprofil der Sauerstoffkonzentration zu erstellen und eine Aussage über die Art der Sauerstoffspezies treffen zu können. Die Messungen wurden dazu von 0 ° bis 60 ° im Abstand von 12 ° durchgeführt. Mit steigendem Winkel nimmt die Eindringtiefe der Röntgenstrahlen ab, wodurch die Informationstiefe ebenfalls abnimmt. Die Abweichung des Gesamtsauerstoffanteils der winkelabhängigen Messung im Vergleich zu den in Tabelle 6 dargestellten Daten, ist darauf zurückzuführen, dass die Messungen mit verschiedenen Folienstücken durchgeführt wurden. Für die unbehandelte Folie ist deutlich erkennbar, dass der Sauerstoffgehalt mit steigendem Winkel zunimmt, während die Kohlenstoffkonzentration geringer wird (Abbildung 9A). Dies bedeutet, dass direkt auf der Oberfläche der Folie, welche für die Haftung relevant ist, die höchste Sauerstoffkonzentration vorliegt und diese zum Folieninneren hin abnimmt. Im Gegensatz dazu zeigt die Corona-behandelte PP-Folie bei geringeren Winkeln, das heißt in tieferen Schichten von etwa 3-5 nm, einen nur geringfügig niedrigeren Sauerstoffgehalt als an der Oberfläche (Abbildung 9B). Dieses Konzentrationsprofil war zu erwarten, da die Corona-Behandlung von PP Oxidationsprozesse in bis zu 7 nm Tiefe anregt.^[98] Insgesamt ist der Sauerstoffgehalt der Folie daher höher, jedoch ist festzuhalten, dass auch die unbehandelte PP-Folie signifikante Mengen an Sauerstoff enthält, welche potentiell Wechselwirkungen mit Adhäsiven eingehen können.

Weiterhin wurden die Signale des Sauerstoffs (O1s) genauer betrachtet und mit dem Kohlenstoffsignal (C1s) verglichen, um eine Aussage über die vorliegende Spezies treffen zu können (Abbildung 9C-F). Das O1s Spektrum beider Proben bei 0 ° zeigt ein einziges Signal, was zunächst auf nur eine O-Spezies hindeutet. Dabei entspricht die Lage des Signals bei

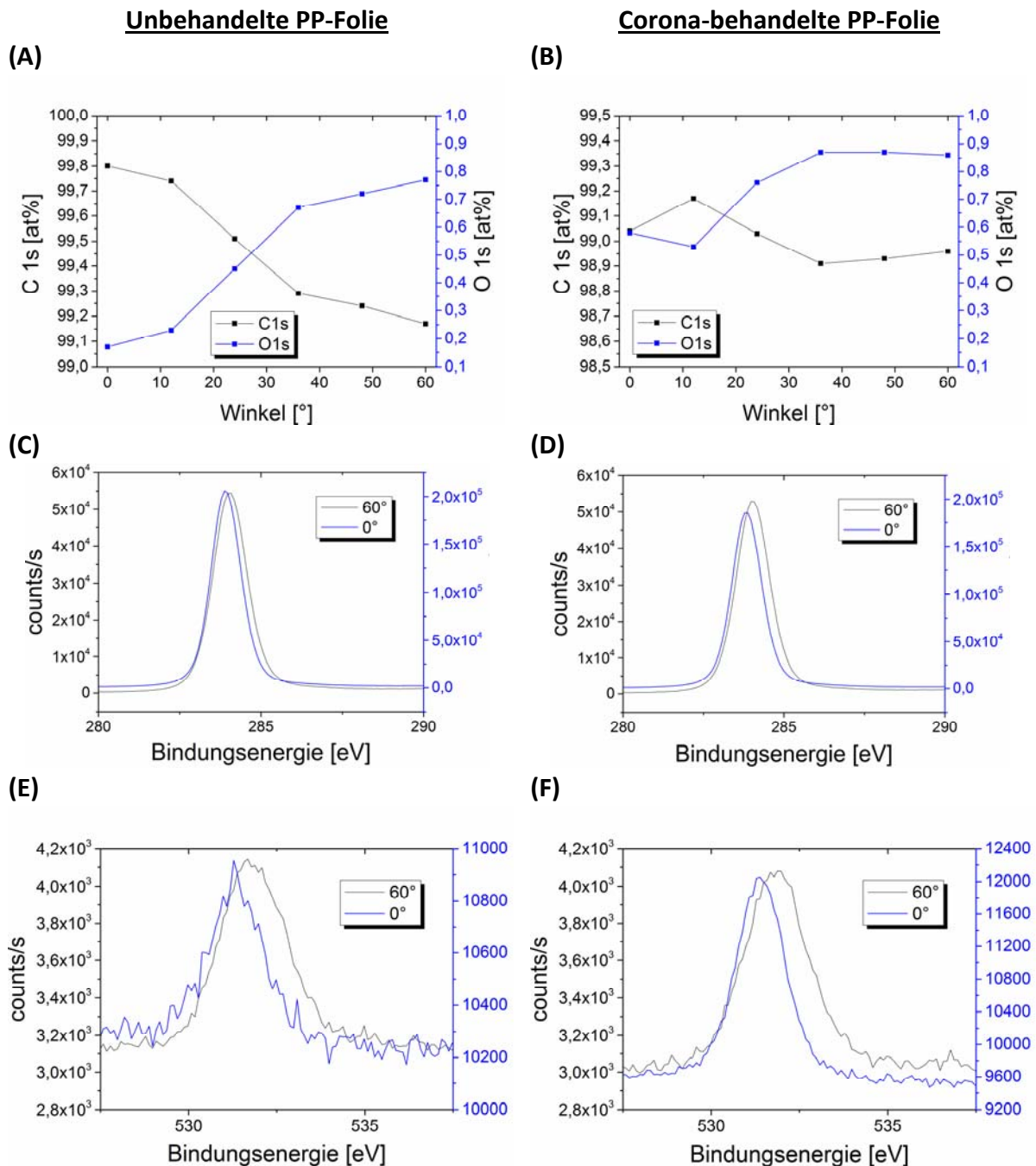


Abbildung 9. Charakterisierung der PP-Folie durch winkelabhängige XPS-Messungen der Oberfläche. **A/B)** Sauerstoff- und Kohlenstoffgehalt der Oberfläche. **C-F)** Ausschnitt des Spektrums mit C1s-Signal (**D/E)** und O1s-Signal (**F/G**). Für die O1s-Signale ist verglichen mit den C1s-Signalen eine größere Verschiebung erkennbar. Bedingungen: Messungen wurden in Winkeln von 0 ° bis 60 ° im Abstand von 12 ° unter Verwendung einer Al-K-Röntgenquelle (1486,68 eV; 400 µm Probengröße) durchgeführt.

531,7 eV einer C-O Spezies, wohingegen C=O-Spezies eher bei 533 eV zu erwarten wären (Abbildung 9E-F). Mit steigendem Winkel ist für beide Folien sowohl für C1s als auch für O1s zu erkennen, dass sich die Form des Signals nicht signifikant verändert. Es ist allerdings eine leichte Verschiebung zu höheren Bindungsenergien zu beobachten. Teilweise wird diese Verschiebung durch die Aufladung der Probe verursacht. Das O1s-Signal zeigt jedoch für beide Proben eine stärkere Verschiebung als das C1s-Signal, was bedeutet, dass nicht nur Aufladung dafür verantwortlich sein kann. Aus diesem Grund ist wahrscheinlich, dass an der Oberfläche neben C-O auch C=O, in Form von Carbonyl- oder Carboxylgruppen, vorhanden ist.

Darüber hinaus kann die Bindungsenergie Differenz (D-Wert) vom größten positiven Maximum bis zum größten negativen Minimum im C(KLL)-Spektrum eine Aussage über das sp^2/sp^3 -Hybridisierungsverhältnis des Kohlenstoffs geben. Für reinen Diamant, welcher eine sp^3 -Hybridisierung aufweist, ist ein D-Wert von 14 eV zu erwarten, während zweidimensionales Graphit mit einer sp^2 -Hybridisierung einen D-Wert von 22 eV hat.^[99] Für beide PP-Proben sind die KLL-Spektren jeweils nahezu identisch, wobei der daraus zu bestimmende D-Wert bei 17 eV liegt (Abbildung 10). Dies zeigt, dass auf beiden Folienseiten Kohlenstoff sowohl in sp^2 - als auch sp^3 -hybridisierter Form vorliegt. Es kann jedoch keine quantitative Aussage getroffen werden, da Referenzen nur für reine Kohlenstoffsysteme wie Diamant und Graphit vorliegen, welche eine hohe Ordnung aufweisen. Der sp^2 -hybridisierte Kohlenstoff kann das Resultat von β -Hydrideliminierungsreaktionen während der Polymerisation des PP sein oder auch von aromatischen Additiven stammen. Das Vorhandensein geringer Mengen verschiedener Sauerstoffspezies sowie Kohlenstoff-Doppelbindungen erhöht die Wahrscheinlichkeit starke Binder für die stark hydrophoben PP-Oberflächen zu generieren.

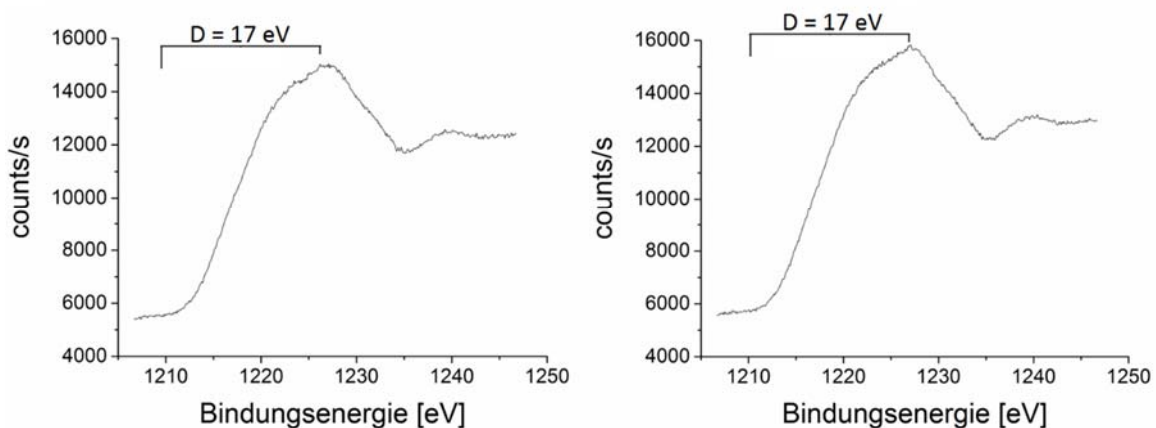


Abbildung 10. C(KLL)-Spektren für PP_{cor} (links) und PP_{unb} (rechts). D-Wert entspricht dem Abstand vom größten positiven Maximum bis zum größten negativen Minimum der Bindungsenergie. Bedingungen: Messungen wurden unter Verwendung einer Al-K-Röntgenquelle (1486,68 eV; 400 μ m Probengröße) durchgeführt.

3.2 Phagendisplay

Es gibt wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben verschiedene Möglichkeiten für die Generierung spezifisch bindender Peptide. Im Gegensatz zu einem rationalen Design und chemischen Bibliotheken bietet die biokombinatorische Methode des Phagendisplay einige entscheidende Vorteile. Zum einen bietet eine Phagenbibliothek einen enorm großen Sequenzraum von 10^9 verschiedenen Peptidsequenzen und zum anderen ist die Isolierung und Analyse der bindenden Phagen vergleichsweise einfach. Für die Phagendisplay-Experimente in dieser Arbeit wurde eine M13 Ph.D-12 Phagenbibliothek verwendet. Die Phagen dieser Bibliothek sind so modifiziert, dass das pIII-Protein N-terminal eine randomisierte 12-mer Peptidsequenz trägt. Die gleiche Sequenz ist dabei an jeder der fünf Kopien des pIII-Proteins eines Phagen vorhanden. Die 12-mer Bibliothek besitzt die gleiche Diversität wie die ebenfalls kommerziell erhältlichen 7-mer Bibliotheken, bietet jedoch den Vorteil einer größeren Anzahl an Funktionalitäten für die Wechselwirkung mit dem Target. Speziell für niedrigenergetische Oberflächen können so Sequenzen selektiert werden, welche mehrere schwächere Bindungen anstelle weniger starker Bindungen ausbilden.

Im ersten Schritt ist es nötig, eine Biopanning-Prozedur für das PP-Target unter Verwendung der 12-mer-Phagenbibliothek zu entwickeln und zu optimieren. Bisher ist nur ein Phagendisplay-Experiment mit einem PP-Target beschrieben, woraus einige wenige 12-mer-Peptide als PP-Binder von der Firma Dupont patentiert wurden.^[100] Die Biopanning-Prozedur gründete sich dabei auf die für Phagendisplay üblichen Waschschrte bei neutralem und saurem pH-Wert. Dafür wurde Tween-20-haltiger TBS-Puffer (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,5) sowie Glycin/HCl-Puffer (pH 2,2) verwendet. Das Tensid Tween-20 wird in Phagendisplay-Experimenten in Konzentrationen von 0,1% - 0,5% zugegeben, um nichtspezifische Wechselwirkungen der Phagen zu unterdrücken. Zusätzlich wurde in dem von Dupont patentierten Verfahren Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt, welches als Blockierungsmittel für die Oberflächen dient und damit verhindern soll, dass die Phagen beispielsweise an die Gefäßwand binden. Abschließend wurde die Infektion der *E. coli* Bakterien vorgenommen, indem das PP-Target direkt und ohne Elution der Phagen in das Nährmedium gegeben wurde.

Der erste Panning-Versuch für die PP-Folie wurde ähnlich des Dupont-Verfahrens unter Verwendung von BSA und einer direkten Bakterieninfektion durchgeführt. Für eine erste Einschätzung des Erfolges wurden die Phagenkonzentrationen nach einigen Waschschrten über Titern der Waschlösungen bestimmt. Hierbei werden die Phagen in *E. coli* inkubiert und auf Agarosegelplatten gegeben, welche einen Farbstoff enthalten. Auf diese Weise werden

die infizierten Kolonien sichtbar und können gezählt werden. Für das Gelingen des Experiments ist es notwendig, die Waschschrte so zu optimieren, dass die nicht- bzw. schwachbindenden Phagen entfernt werden, nicht jedoch die starken Binder. Für diesen Versuch ergab sich eine exponentielle Abnahme der eluierten Phagen, das bedeutet, die ersten Waschschrte entfernten sehr viele Phagen und die späteren zunehmend weniger. Die Sanger-Sequenzierung von 11 Phagen nach der ersten Panning-Runde, ergab jedoch 10 Phagen ohne Insert, das heißt ohne randomisierte 12-mer Sequenz. Diese Wildtypphagen sind ein Resultat der Herstellungsprozedur der Phagenbibliothek und sind in der ursprünglichen Bibliothek zu 13% vorhanden. Werden die Phagen ohne Insert angereichert, ist dies ein Hinweis auf das Vorliegen unspezifischer Wechselwirkungen. Eine Wiederholung des Biopannings mit etwas intensiveren Waschschrten führte dazu, dass überhaupt keine Phagen am Target hafteten. Problematisch ist hierbei die Verwendung von BSA, welches nicht nur die Oberfläche der verwendeten Eppendorfgefäße blockiert, sondern vermutlich auch die Oberfläche des Targets. Dies kann zu unspezifischen Wechselwirkungen führen, welche die hohe Zahl an Phagen ohne Insert verursachen. Im Folgenden wurde das Biopanning-Protokoll daher grundlegend verändert, um unspezifische Bindungen weitestgehend zu unterdrücken. Auf die Zugabe von BSA wurde verzichtet und darüber hinaus wurde die Inkubationszeit des Targets mit den Phagen von 15 Minuten auf 5 Minuten verkürzt. Ein Verzicht auf das Tensid Tween-20, welches unspezifisch bindende Phagen durch das Ausbilden hydrophober Wechselwirkungen von der Oberfläche entfernt, ist dagegen nicht sinnvoll. Eine Absenkung der Tween-20-Konzentration wird nur für Targets empfohlen, bei welchen wenige, sehr spezifisch bindende Phagen zu erwarten sind.^[101]

Zusätzlich wurden die Phagen vor der Infektion der Bakterien durch tryptischen Enzymverdau vom PP Target eluiert. Dies stellt einen besseren Ansatz dar, da bei der direkten Infektion des Nährmediums durch das mit Phagen behaftete Target davon auszugehen ist, dass sich die am stärksten bindenden Phagen nicht vom Target lösen und daher nicht amplifiziert werden. Das optimierte Panning-Protokoll wurde für beide Seiten der PP-Folie getrennt angewendet, sodass die Phagen zu keiner Zeit der jeweils anderen Seite ausgesetzt waren. Zur Anreicherung von guten Bindern wurde der Panning-Zyklus dreimal wiederholt, wobei der Selektionsdruck in jeder Runde in Form von stärkeren Waschschrten erhöht wurde. Zusätzlich wurde ein weiteres Phagendisplay-Experiment mit der isotaktischen PP-Folie durchgeführt. Hierfür war eine Reduktion der Waschschrte nötig, um nicht alle Phagen zu entfernen, was durch die geringere Probengröße und damit einhergehende geringe Oberfläche im Vergleich zur technischen PP-Folie zu erklären ist.

Im Anschluss an die Phagendisplay-Experimente werden die randomisierten 12-mer-Peptidsequenzen durch das Sequenzieren der DNA und die Übersetzung des codierenden DNA-Abschnitts über den genetischen Code erhalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei DNA-Sequenzierungsmethoden angewendet und verglichen. Im folgenden Kapitel wird zunächst die für Phagendisplay bereits etablierte Sanger-Sequenzierung beschrieben.

3.3 Sequenzierung der Phagen-DNA

3.3.1 Sanger-Sequenzierung und Sequenzanalyse

3.3.1.1 PP-Folie ohne Vorbehandlung

Für die verschiedenen PP-Targets wurden einzelne Klone nach jeder Panning-Runde mit der Sanger-Methode sequenziert. Dafür wurden einzelne Phagenkolonien von Titerplatten ausgewählt und amplifiziert um anschließend die Phagen-DNA zu extrahieren. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung bindender Phagenklone der unbehandelten PP-Folie, für welche die meisten Phagen sequenziert wurden. Es ist anzumerken, dass nicht alle ausgewählten Phagenklone erfolgreich sequenziert werden können, da die DNA-Extraktion teilweise nicht zu ausreichenden DNA-Mengen führt. Somit ergab sich eine ungleiche Anzahl Peptidsequenzen pro Panning-Runde.

Die erhaltenen Sequenzen für insgesamt 76 untersuchte Phagen für PP_{unb} sind in Tabelle 7 dargestellt. Nach den ersten beiden Runden enthielten alle 14 bzw. 24 sequenzierten Phagenklone jeweils eine andere Sequenz, nach der dritten Runde werden jedoch einige Sequenzen mehrfach gefunden. Über 50% der sequenzierten Phagen mit Insert enthielten die 12-mer-Sequenz DYHDP_{SL}PTLRK. Die Diversität des Sequenzpools nimmt demnach nach der dritten Panning-Runde stark ab. Der Anteil der Sequenzen ohne Insert liegt insgesamt bei 21% und konnte damit im Vergleich zum vorherigen Phagendisplay-Protokoll deutlich reduziert werden.

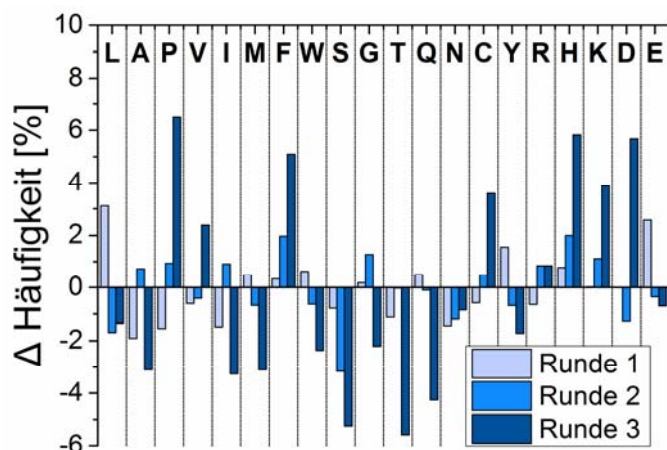
Bei Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung der gefundenen Peptidsequenzen, ist nach der dritten Panning-Runde verglichen mit einer Referenzphagenbibliothek (siehe Kapitel 3.5.2) eine Unterdrückung der hydrophoben Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin und Tryptophan sichtbar, während Phenylalanin durch das Vorkommen einer Sequenz mit vier Phenylalaninresten insgesamt angereichert ist (Abbildung 11A). Weiterhin werden die basischen Aminosäuren Histidin und Lysin sowie Prolin angereichert. Die saure Aminosäure

Asparaginsäure findet sich vermehrt ab der dritten Runde, wobei zwei der vier Sequenzen jeweils zwei Asparaginsäurereste aufweisen.

Tabelle 7. Dargestellt sind die erhaltenen 12-mer-Peptidsequenzen nach Sanger-Sequenzierung einzelner Phagenklone für das Screening gegen die unbehandelte PP-Folie (Mehrfach auftretende Sequenzen oder Motive fett/unterstrichen markiert; Aminosäureklassen (basisch, sauer, hydrophob, polar) farblich unterschieden.

1. Panning Runde	2. Panning Runde	3. Panning Runde	
FSVQKYTAMETH	AANSVWKRATFI	FSVQKYTAMETH	DYHDPSTLPTLRK (12x)
SVPNEYGGHPSL	WANSVQRVLTHI	QGLSLKEDTVKH	GNNPLHVHDKR (3x)
KGPADPLELFLH	EANLRCDGACFP	GQALVPHPDSSR	VCSPCGPVPPAK
TAAAFSDLLRGT	HMSHLSRNWHTS	GVPIGYHNIHRS	RFFDSEFDVAFH
NYYLPYEPLKWK	HMSAKSPTFPRS	SYQVHATAATL	
ESGLRRAFYTWT	ST FISPGHLLTK	GPTKGFAFEIAT	
EHQETVVFVGSYM	FD FISPGFQHTG	TGIKSGDFQGNV	
DISRGTASDSRL	APHFL VGDMVAV	DLELRSPDLMYS	
ITPPWHDSDVIL	NKHGAV VGIEAVA	RRLPTRIHLRMN	
VSHQRQAWLYDL	TSPFQDGT PRQY	HIAQWKIRPEPN	
SLQGSHERPMV	TSQFYRPP SHDN	GWCGRGGATPHP	
QGPQSNMTPLNL	SNATP FYRPP VYV	YPTLPQMPGLRA	
VVSR TMSYFNHS			
WNHLGSAMDLEQ			
3x kein Insert	4x kein Insert	9x kein Insert	

(A)



(B)



Abbildung 11. (A) Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren nach jeder Biopanning-Runde des Phagendisplay für PP_{unb} im Vergleich zur einmal amplifizierten Referenzbibliothek. Mehrfach auftretende Sequenzen wurden einfach gezählt. **(B)** Mittels MEME-Algorithmus gefundenes Motiv im Sanger-Sequenzpool des Screenings auf der unbehandelten PP-Folie. Bedingungen des MEME-Scans: Motivbreite: 2-12; Mindestzahl der Sequenzen mit Motiv: 2.^[91]

Es ist festzustellen, dass beide mehrfach gefundenen Sequenzen einen hohen Anteil geladener Aminosäuren sowie wasserstoffbrückenbildender Aminosäuren aufweisen, während für die einfach auftretenden Sequenzen die hydrophoben Aminosäuren Valin und Phenylalanin dominieren. Beispielsweise sind hydrophobe Wechselwirkungen der Phenylalanin-haltigen Sequenz RFFDSEFDVAFH mit der PP-Oberfläche denkbar. Unter den mehrfach auftretenden Sequenzen deutet die Anreicherung von basischen und sauren Funktionen bei gleichzeitiger Verdrängung von hydrophoben Aminosäuren auf Bindungen hin, welche nicht durch van-der-Waals-Wechselwirkungen bestimmt werden.

Im Folgenden wurden die Sequenzen auf wiederkehrende Bindungsmotive untersucht. Unter den Sequenzen der zweiten Runde finden sich Tri-, Tetra- und Pentapeptide, welche jeweils in zwei 12-mer-Peptiden auftreten (z.B. ANSV, HMS, FISPG, FYRP). Diese Oligopeptide enthalten sowohl hydrophobe als auch polare und basische Aminosäuren. Die Sequenz FSVQKYTAMETH tritt sowohl in der ersten als auch in der zweiten Runde auf, was ein hohes Vorkommen in der Gesamtbibliothek nahelegen könnte, wird aber nicht nach der dritten Runde gefunden. Zusätzlich wurden die Sequenzen mittels eines Algorithmus für Motivsuche in Proteinen und Peptiden nach wiederkehrenden Motiven durchsucht. Die MEME-Analyse^[91] ergab für die zweite Runde ein Motiv mit ausreichender Signifikanz, welches in drei der 24 Peptidsequenzen auftritt (Abbildung 11B). Wird nun die dritte Runde betrachtet, findet sich keines der in Runde 2 wiederholt auftretenden Peptidmotive wieder, da der Sequenzpool der dritten Runde von nur zwei verschiedenen Sequenzen dominiert wird.

Mittels Datenbanken können die erhaltenen Peptide mit denen anderer Phagendisplay-Experimente verglichen werden. Beispielsweise sind alle literaturbekannten, durch Phagendisplay selektierten Peptidsequenzen in der MIMO-Datenbank gespeichert.^[102] Zusätzlich liefert die SAROTUP-Datenbank (Scanner And Reporter Of Target-Unrelated Peptides) Hinweise auf das Vorliegen von Target-unspezifischen Sequenzen, welche an andere Komponenten im Screeningprozess binden. Ein Abgleich mit SAROTUP zeigt, dass im Sanger-Sequenzpool keine literaturbekannten Target-unspezifischen Bindungsmotive vorhanden sind. In der MIMO-Datenbank sind jedoch drei Sequenzen der dritten Runde für sehr verschiedene Targets gespeichert. Die Sequenzen DYHDPSPPTLRK, GNNPLHVHDDKK und VCSPCGPVPPAK wurden in zwei unabhängigen Arbeiten in Phagendisplay-Experimenten gegen verschiedene monoklonale Antikörper selektiert und wiesen dabei im Vergleich zu den anderen selektierten Sequenzen teilweise höhere Affinitäten auf.^[103] Die Sequenz GNNPLHVHDDKK wurde darüber hinaus in zwei weiteren Experimenten mit einem Glykoprotein sowie lymphozytischen Zellen als Targets gefunden.^[104] Auch wenn es nicht ausgeschlossen ist, dass die gleiche Peptidsequenz eine starke Affinität für mehrere

vollkommen verschiedene Targets besitzt, ist es dennoch wahrscheinlich, dass für diese Sequenzen ein Amplifizierungsvorteil vorliegt. Studien zeigten, dass solche Sequenzen auch bei schwacher Bindung an das Target nach nur wenigen Amplifizierungsschritten den Großteil der Bibliothek darstellen.^[105] Um diesen Effekt sichtbar zu machen und in die Auswertung der Sequenzen einzubeziehen ist eine deutlich höhere Zahl an Sequenzen nötig, wie sie nur mit NGS-Methoden erreicht werden kann.

3.3.1.2 Corona-behandelte PP-Folie

Für die Corona-behandelte PP-Folie wurden insgesamt 33 Phagenklone sequenziert, wobei die Sequenzen einer Runde jeweils einfach auftraten (Tabelle 8). Dies deutet auf eine höhere Diversität der Bibliothek für dieses Target nach der dritten Panning-Runde im Vergleich zur Bibliothek PP_{unb} hin. Die Hauptsequenz der dritten Runde für die unbehandelte PP-Folie (DYHDSLPTLRK) findet sich ebenfalls im Corona-Sequenzpool, jedoch nur jeweils einmal nach der ersten und zweiten Runde. Offenbar liegt im Vergleich zur unbehandelten PP-Folie keine starke Anreicherung dieser Sequenz vor oder die Zahl von 11 sequenzierten Klonen ist nicht ausreichend um dies zu zeigen. Der Anteil der Phagen ohne Insert beträgt 24% und steigt damit leicht im Vergleich zur unbehandelten PP-Folie.

Tabelle 8. Dargestellt sind die erhaltenen 12-mer Peptidsequenzen nach Sanger-Sequenzierung einzelner Phagenklone für das Screening auf der Corona-behandelten PP-Folie (Fett gedruckte Sequenzen und Motive treten mehrfach auf; Aminosäureklassen farblich unterschieden).

1. Panning Runde	2. Panning Runde	3. Panning Runde
DYHDSLPTLRK	DYHDSLPTLRK	QVNGLGERSQQM
ADRSRLRDHPYRY	DKYDPSMPALNQ	GVNRGAQ DYHYP
ADSFSEVVRHRD	RDYHPRDHTATW	SSF D TPYHV KRR
SSE S ASALLRRL	VSATFRPLPID F	GLK NDSGD HMRR
SYLG T GSSV KKL	E HLPSGGVPRST	GKY E PPY PHNQRT
SIPQ TNRMTDKA	NGLK VSVLDRWM	YSAHG VISYLHS
TS E NQ RTK SWPV	SAMKGVPTAWLP	FNGMG KLQVNTG
GHVRHPGTWQMD		LPSPSTRMNSLA
VTHLPPVNLATL		
NLP HAWGLSALA		
2x kein Insert	3x kein Insert	3x kein Insert

Bezüglich der Aminosäure-Zusammensetzung ist eine Unterdrückung hydrophober Aminosäuren und eine Anreicherung basischer Aminosäuren zu beobachten (Abbildung 12). Nach der dritten Runde ist die Aminosäure Glycin stark angereichert, welche typischerweise aufgrund von Amplifizierungstendenzen unterdrückt wird. Darüber hinaus enthält keine der

25 Sequenzen die Aminosäure Cystein. Das Tripeptid DYH findet sich in vier Sequenzen und das Asparaginsäure-haltige Motiv D(x)₂DPSxPxL ist in zwei Sequenzen der zweiten Runde enthalten, wodurch Asparaginsäure im Sequenzpool der zweiten Runde stark angereichert ist. Ein Abgleich mit der MIMO-Datenbank liefert Übereinstimmungen mit den Sequenzen RDYHPRDHTATW und QVNGGLGERSQQM, welche bei Phagendisplay-Experimenten mit monoklonalen Antikörpern bzw. Zellrezeptorproteinen selektiert wurden.^[103b, 106] Es ist folglich davon auszugehen, dass auch die Präsenz dieser Sequenzen hauptsächlich auf einen Amplifizierungsvorteil zurückzuführen ist.

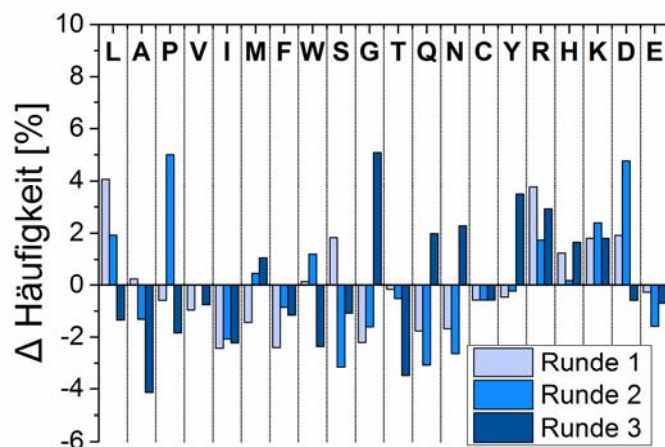


Abbildung 12. Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren nach jeder Biopanning-Runde des Phagendisplays für PP_{cor} im Vergleich zur einmal amplifizierten Referenzbibliothek. Mehrfach auftretende Sequenzen wurden einfach gezählt.

3.3.1.3 Isotaktische PP-Folie

Für die selbst angefertigte PP-Folie aus rein isotaktischem Polypropylen, welche in einer Polymerpresse hergestellt wurde, war eine Reduzierung der Waschschrte während des Biopannings nötig (Kapitel 3.2). Nach der zweiten und dritten Panning-Runde wurden 24 Phagenklone sequenziert, wovon drei Sequenzen bereits im Sequenzpool der anderen PP-Targets auftreten (Tabelle 9). Die Sequenz DYHDPSSLPTLRK, welche auch für PP_{unb} dominiert, ist nach der dritten Runde die häufigste Sequenz. Der Anteil der Sequenzen ohne Insert ist mit 29% für PP_{iso} höher als für die beiden Seiten der technischen PP-Folie. Die Reduktion der Waschschrte aufgrund der geringeren Probengröße und der damit einhergehenden geringeren Oberfläche, führte möglicherweise vermehrt zu unspezifisch bindenden Phagen. Weiterhin könnten durch die Herstellungsart bedingte Unterschiede in der Topologie einzelner Folienstücke die Tendenz zu unspezifischen Bindungen erhöhen.

Tabelle 9. Dargestellt sind die erhaltenen 12-mer Peptidsequenzen nach Sanger-Sequenzierung einzelner Phagenklone für das Screening auf der isotaktischen PP-Folie. (Fett gedruckte Sequenzen und Motive treten mehrfach auf; Aminosäureklassen farblich unterschieden).

2. Panning Runde	3. Panning Runde
EGLYGSL SKDFD	DYHDP SLPTLRK (4x)
LDMTPG CSKDFK	QVNGLG ERS QQM
ASTHHNHQR DCN	NGTTTVTIARGA
GITN VVS PRDRV	GL D SGYVPSRYQ
ATAD PVVS LGVN	GVPLMHKTWLPQ
VV HTQALRNSTM	AQTNANMSTAFG
SSVGVG HE PRPS	
MPQAHGFSVWAN	
4x kein Insert	3x kein Insert

Wird die Aminosäurezusammensetzung betrachtet, zeigt sich eine Anreicherung von Glycin, Threonin und Glutamin (Abbildung 13). Weiterhin wurden zwei Sequenzen mit einzelnen Cysteinen selektiert, welche in Phagendisplay-Experimenten zumeist stark unterdrückt werden. Die hydrophoben Aminosäuren sind ähnlich den anderen PP-Targets im Vergleich zur Referenzphagenbibliothek unterdrückt.^[105a] Eine Ausnahme bildet hier Valin, welches nach der zweiten Runde stark angereichert ist und in fünf der acht Sequenzen teilweise mehrfach auftritt. Drei der acht Sequenzen enthalten ein VV-Dipeptid. Die hydrophobe Valin-Seitenkette ist aufgrund der elektronischen Struktur gut geeignet um van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der hydrophoben PP-Oberfläche auszubilden, wodurch eine Anreicherung Valin-haltiger Peptidsequenzen erklärt werden könnte. Darüber hinaus findet sich in zwei Sequenzen das Tetrapeptid SKDF, welches alle Aminosäureklassen repräsentiert. Eine Anreicherung von Valin oder den genannten Motiven nach der dritten Panning-Runde ist jedoch nicht zu beobachten.

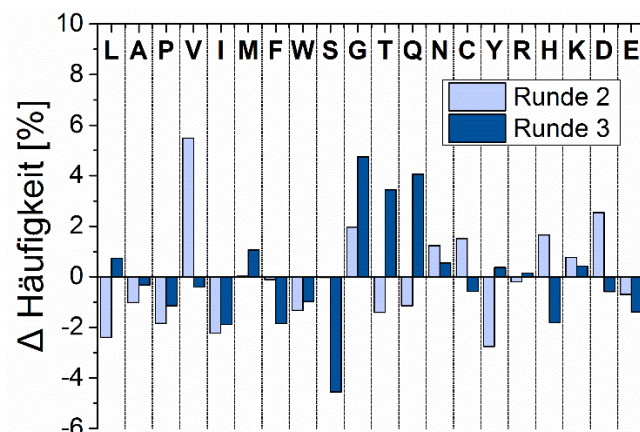


Abbildung 13. Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren nach zwei bzw. drei Biopanning-Runden des Phagendisplays für PP_{iso} im Vergleich zur einmal amplifizierten Referenzbibliothek. Mehrfach auftretende Sequenzen wurden einfach gezählt.

3.3.1.4 Vergleich der Sequenzpools verschiedener PP-Targets

In einem Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung für die verschiedenen PP-Folien wird eine große Ähnlichkeit der erhaltenen Sequenzen sichtbar. Die insgesamt am häufigsten gefundene Sequenz DYHDP_{SLPTLRK} wurde für alle drei Targets selektiert und dominiert den Sequenzpool nach drei Runden für die unbehandelte und die isotaktische PP-Folie. Weiterhin ist eine Unterdrückung der hydrophoben Aminosäuren für alle Targets zu verzeichnen (Abbildung 14), wobei Valin und Phenylalanin für PP_{unb} eine Ausnahme bilden. Basische Aminosäuren wurden beim Screening auf beiden Seiten der PP-Folie angereichert. Dies ist ein Indiz für die Ausbildung von Ladungswechselwirkungen zwischen den Peptiden und der PP-Oberfläche anstelle von oder zusätzlich zu van-der-Waals-Wechselwirkungen durch hydrophobe Aminosäuren. Wie die in Kapitel 3.1 beschriebenen XPS-Messungen zeigen, befindet sich ein geringer Anteil Sauerstoff in Form von Hydroxyl- sowie Carbonyl- oder Carboxylgruppen auf der PP-Oberfläche. Beispielsweise könnten Salzbrücken zwischen Carboxylaten und positiv geladenen Aminosäuren zur Bindung der Peptide beitragen.

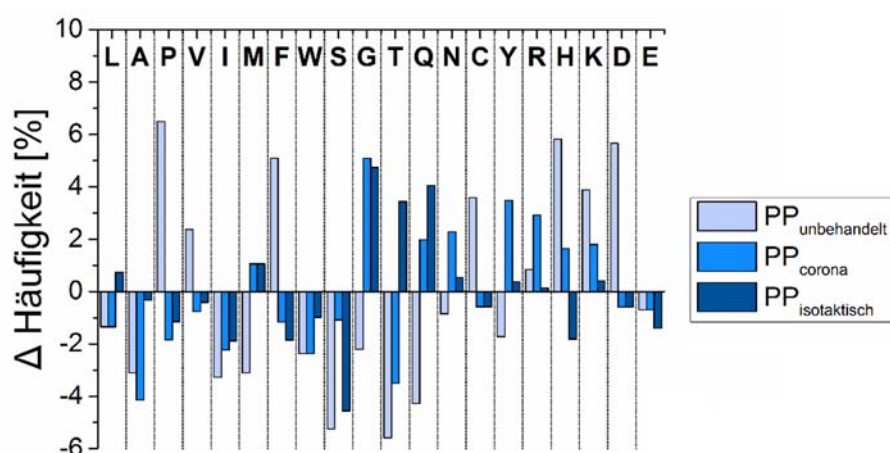


Abbildung 14. Vergleichende Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung der Sanger-Sequenzpools. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren nach drei Biopanning-Runden des Phagendisplays im Vergleich zur einmal amplifizierten Referenzbibliothek. Mehrfach auftretende Sequenzen wurden einfach gezählt.

Die durchschnittliche Nettoladung der selektierten Peptide der dritten Panning-Runde bei neutralem pH-Wert liegt für alle Targets im positiven Bereich und ist für die Corona-behandelte PP-Folie mit +0,9 am höchsten (Tabelle 10). Positiv geladene Aminosäuren können insbesondere auf der Corona-behandelten PP-Oberfläche, welche einen doppelt so hohen Sauerstoffgehalt wie die unbehandelte Oberfläche aufweist, zur Bindung beispielsweise über Salzbrücken beitragen. Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung sind vor allem im Bereich der polaren Aminosäuren zu verzeichnen. Beispielsweise sind Threonin und Glutamin

für PP_{iso} angereichert, wohingegen eine Anreicherung von Tyrosin und Asparagin ausschließlich für PP_{cor} beobachtet wurde. Die durchschnittlichen Anteile der hydrophoben bzw. geladenen sowie der wasserstoffbrückenbildenden Aminosäuren sind für die selektierten Peptide der dritten Runde für die verschiedenen PP-Oberflächen ähnlich.

Tabelle 10. Vergleich der erhaltenen Sequenzen nach der dritten Runde Biopanning auf PP-Folien bezüglich verschiedener Sequenzeigenschaften wie Ladung, Hydrophobie und die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken).

Eigenschaft der Peptide	PP _{unbehandelt}	PP _{corona}	PP _{isotaktisch}
Nettoladung (pH 7)	+0,1	+0,9	+0,4
Anteil geladener Seitenketten	35%	25%	21%
Anteil hydrophober Seitenketten	35%	33%	46%
Anteil H-Brücken bildender Seitenketten	54%	60%	54%

Die Diversität des Sequenzpools nimmt erwartungsgemäß nach der zweiten Panning-Runde ab, mit Ausnahme der Corona-behandelten Folie, für welche keine Sequenzen mehrfach auftreten. Peptidsequenzen, welche gemeinsame Tri-, Tetra oder Pentapeptide enthalten, wurden hauptsächlich nach der zweiten Runde beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden die Peptide, welche Übereinstimmungen mit der Mimo-Datenbank lieferten und demnach bereits bei Phagendisplay-Experimenten mit gänzlich verschiedenen Targets selektiert wurden, hauptsächlich nach der dritten Runde verzeichnet. Anhand dieser Beobachtungen wurde entschieden, die Phagenbibliotheken jeweils nach der zweiten Panning-Runde für die Illumina-Sequenzierung zu verwenden. Zusätzlich wurde die Bibliothek der ersten Runde für die unbehandelte PP-Folie mittels Illumina sequenziert, da für biologische Targets bereits eine Runde Biopanning kombiniert mit NGS-Methoden ausreichen kann, um starke Binder zu erwartet, was einen weiteren Vorteil darstellt.

3.4 Vorbereitung der Phagenbibliotheken für NGS

Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung, bei welcher einzelne Phagenklone untersucht werden, kann mittels NGS-Methoden die gesamte Phagenbibliothek parallel sequenziert werden. Das Genom der M13 Phagen (M13KE) besteht aus 6700 Basenpaaren und beinhaltet nur eine Kopie des Gen III, welches das pIII-Protein codiert. Dieses Protein enthält die gesuchte randomisierte 12-mer Peptidsequenz am N-terminalen Ende. Entsprechend dem genetischen Code, welcher besagt, dass jeweils drei DNA-Basen für eine Aminosäure codieren, besteht die für das 12-mer Peptid codierende DNA-Sequenz aus 36 Basen. Der übrige Teil des Genoms ist

identisch für alle Phagenklone. Das bedeutet, dass eine Sequenzierung des kompletten Phagen-genoms in >99% überflüssigen Daten resultieren würde. Aus diesem Grund wurde eine Polymerasekettenreaktion (*engl.* PCR) durchgeführt, wodurch lediglich der für die Analyse interessante DNA-Abschnitt amplifiziert wird. Für die PCR mussten zunächst jeweils ein Vorwärts- und Rückwärts-DNA-Primer erstellt werden, welche bestimmte Anforderungen erfüllen sollen. Gute Primer bestehen aus 18 - 30 bp, besitzen eine ähnliche Schmelztemperatur und einen GC-Gehalt von 40% bis 60%.^[101] Darüber hinaus sollten Wiederholungen von Dinukleotiden oder mehr als vier einzelnen Basen, wie beispielsweise GCGCGCGC oder AAAAA, vermieden werden. Zusätzlich wurde das Primer3Plus Programm verwendet um geeignete Primerpaare zu berechnen.^[107] Der anhand der genannten Faktoren ausgewählte Vorwärts-Primer 5'-TTGTCGTCTTTCCAGACGTT-3' liegt 68 bp vor dem Insert und der Rückwärts-Primer 5'-GCAAGCTGATAAACCGATACA-3' liegt 97 bp hinter dem Insert. Das resultierende PCR-Produkt besteht somit aus 242 bp, wobei das 36 bp Insert innerhalb der ersten 100 bp hinter dem Vorwärts-Primer liegt, in welchen die Illumina-Sequenzierung am genauesten ist (Abbildung 15).

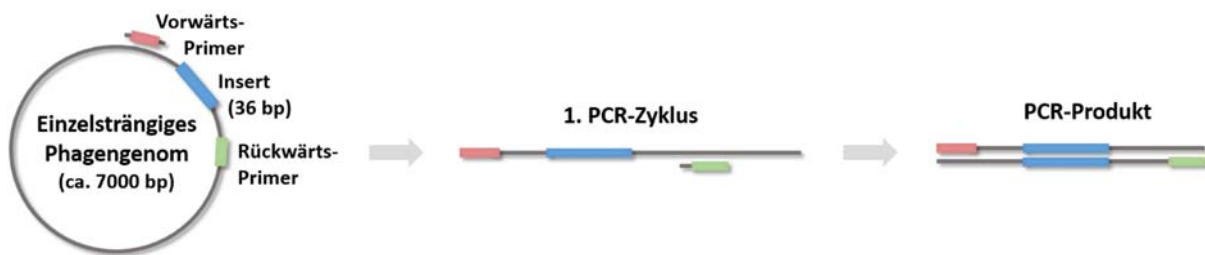


Abbildung 15. Schematische Darstellung der PCR zur Herstellung einer Amplikon-Phagenbibliothek. Durch die richtige Wahl der Primersequenzen wird ausschließlich die Insertregion vervielfältigt.

Im nächsten Schritt wurde die PCR mit den gewählten Primern durchgeführt. Typischerweise werden in einer PCR drei Reaktionsschritte in mehreren Zyklen wiederholt, um die Ziel-DNA anzureichern. Zuerst wird die DNA bei etwa 95 °C denaturiert, anschließend lagern sich die Primer bei 50 - 65 °C an den DNA-Template Strang an und die DNA-Polymerase synthetisiert den Folgestrang bei 72 °C. Im Fall des Phagen-genoms, welches aus zirkulärer Einzelstrang-DNA besteht, wird im ersten Zyklus der Gegenstrang beginnend mit der Vorwärts-Primersequenz synthetisiert. Im zweiten Zyklus bindet der Rückwärts-Primer an den neu synthetisierten Strang und es entsteht der Template-Strang. Nun ist doppelsträngige DNA vorhanden, welche in den folgenden PCR-Zyklen exponentiell vervielfältigt wird. Die Annealing-Temperatur (T_a), bei welcher die Primer angelagert werden, variiert je nach deren Sequenz und muss daher optimiert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Temperatur-Scan-PCR mit

Temperaturen zwischen 47 °C und 53 °C durchgeführt und die Reaktionsgemische anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 16). Bei einer T_a von 50,6 °C ist eine breite Bande unterhalb von 500 bp sichtbar, welche dem gewünschten PCR-Produkt entspricht. Die erhaltenen Amplikon-Bibliotheken wurden nach Extraktion und Aufreinigung aus dem Elektrophorese-Gel auf einer Illumina-HiSeq-Plattform sequenziert.

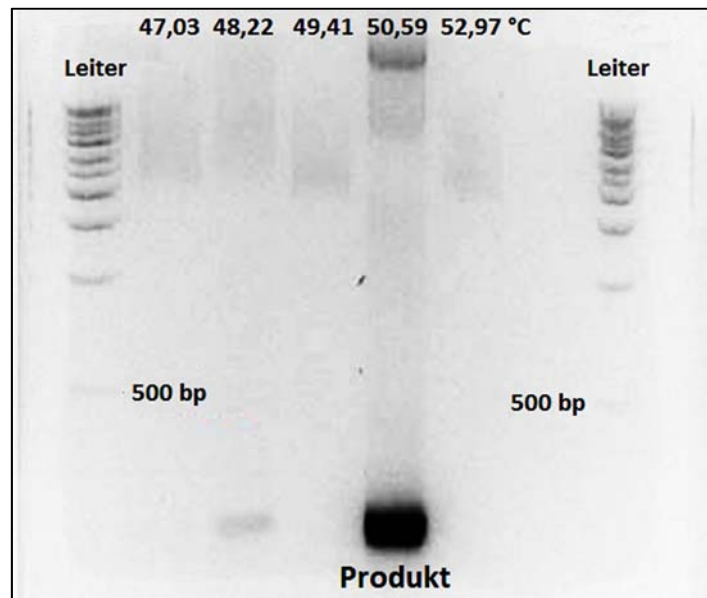


Abbildung 16. Aufnahme des Elektrophorese-Gels unter UV-Licht nach der T-Scan-PCR. Gewünschtes PCR-Produkt (242 bp) bei 50,59 °C. Bedingungen: 3% Agarose in TAE-Puffer; 100 V; 35 min.

3.4.1 Entwicklung eines Computerprogramms zur Sequenzdatenauswertung

Die Illumina-Sequenzierung der Amplikon-Bibliotheken resultiert in Datenmengen von mindestens 1,5 GB Rohdaten für jede Probe. Für die Auswertung dieser enormen Datensätze wurde in Kooperation mit Dr. Tim Conrad von der Freien Universität Berlin ein Programm entwickelt.^[108] Die Illumina-Sequenzierung wurde, wie im Kapitel 2.6.1 beschrieben, durch Paired-End-Reading durchgeführt, wodurch für jeden DNA-Read ein zweiter Read vorliegt, welcher dem revers-komplementären DNA-Strang entspricht (Abbildung 17). Die Readlänge

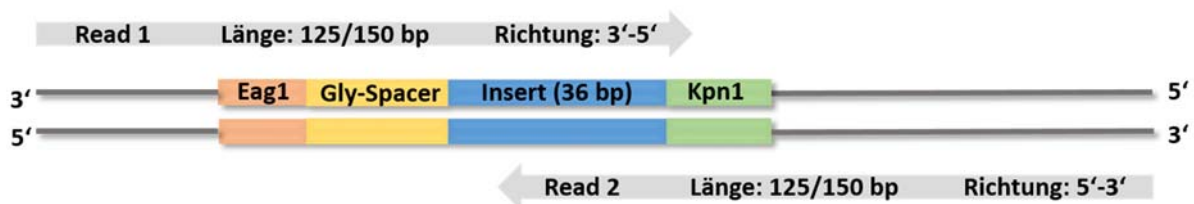


Abbildung 17. Schematische Darstellung der DNA-Reads, die durch Illumina Paired-End-Sequenzierung der Amplikon-Phagenbibliotheken erhalten werden. Die erhaltenen DNA-Reads sind zueinander jeweils revers-komplementäre Stränge. Der Daten-Output besteht aus zwei Dateien, welche jeweils einen der beiden Reads für jeden sequenzierten Amplikon-Phagenklon enthalten.

beträgt 125 bp bzw. 150 bp bei späteren Sequenzierungen, wodurch ein überlappender Abschnitt von 8 bzw. 58 bp entsteht. Die Erhöhung der Readlänge ist auf eine technische Umstellung beim Sequenzierdienstleister zurückzuführen und hat keinen Einfluss auf die Qualität der erhaltenen Sequenzdaten.

Zunächst ist es nötig, die im FastQ Format gelieferten DNA-Sequenzen in die entsprechenden Peptide zu übersetzen. Die dafür nötigen Schritte des Programms sind in Abbildung 18 dargestellt. Im ersten Schritt wird einer der beiden Reads in den revers-komplementären Strang übersetzt, sodass die überlappende Sequenz identisch ist. Anschließend werden der überlappende Abschnitt sowie die bekannten Insert-flankierenden Sequenzen Eag1 und Kpn1 identifiziert. Zunächst führte dieser Schritt zu nur ca. 10% auswertbaren Peptidsequenzen, infolgedessen weitere Bedingungen eingeführt wurden. Da einige Reads geringfügig von der angestrebten Readlänge abweichen und damit auch die Länge der überlappenden Sequenz variiert, wurde für diese eine variable Länge erlaubt.

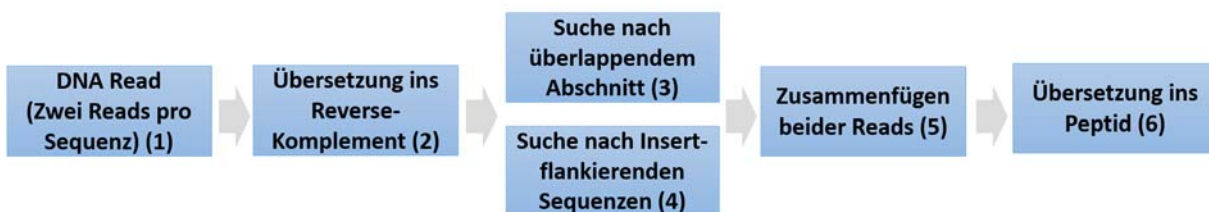


Abbildung 18. Schematische Darstellung des Programms zur Auswertung der Illumina-Daten in Kooperation mit Dr. Tim Conrad (FU Berlin). **(1)** Die DNA-Rohdaten bestehen aus zwei FastQ-Dateien mit komplementären Reads der gleichen 242-bp-Ursprungssequenz. **(2)** Einer der Reads wird in das Reverse-Komplement übersetzt. **(3-4)** Die flankierenden Sequenzen und der überlappende Abschnitt werden identifiziert. Dabei sind zwei fehlerhafte Basen in den flankierenden Sequenzen erlaubt. **(5)** Beide Reads werden anhand des überlappenden Abschnitts zu einer Sequenz zusammengefügt. **(6)** Über den genetischen Code wird die DNA-Sequenz in eine Peptidsequenz überführt. Verschiedene Fehlerkorrekturen werden mit den erhaltenen Peptidsequenzen durchgeführt.

Darüber hinaus ist die Illumina-Sequenzierung vergleichsweise fehleranfällig mit Fehlerraten im Bereich von 0,1% (Kapitel 2.6.1). Tritt eine fehlerhafte Base in einer der beiden Reads im überlappenden Abschnitt auf, kann dieser nicht mehr identisch sein. Aus diesem Grund wurden pro Sequenz zwei Fehler im überlappenden Abschnitt erlaubt, jedoch ausschließlich in den flankierenden Bereichen Eag1 und Knp1, nicht aber im Insertbereich um kein fehlerhaftes Peptid zu erhalten. Dies erhöhte die Anzahl der auswertbaren Sequenzen deutlich auf etwa 70% der Rohsequenzen. Nach der erfolgreichen Identifizierung der überlappenden Sequenz wurden beide Reads zu einem Read zusammengefügt und im letzten Schritt über den genetischen Code in das korrespondierende Peptid übersetzt. Ein kleiner Teil der Peptide wies eine Länge von nur 11 Aminosäuren auf und wurde aus diesem Grund nicht

zur Auswertung herangezogen (Tabelle 11; 3). Das Auftreten kürzerer Sequenzen wird wahrscheinlich durch fehlerhafte Sequenziervorgänge verursacht, könnte aber auch auf Fehler bei der Herstellung der Phagenbibliothek zurückzuführen sein.

Weiterhin wurden aufgrund der bekannten Fehleranfälligkeit der Illumina-Sequenzierung einige Schritte zur Fehlerkorrektur, ähnlich den Arbeiten von Derda und Rebollo, eingefügt.^{[90,}

^{93]} Die Genauigkeit der Fluoreszenzdetektion ist für jede Base eines Reads in Form eines Qualitätswerts (Q-Wert) angegeben, welche auf einem im Bereich der DNA-Sequenzierung verbreiteten Programm (Phred base-calling) basiert.^[109] Überlagern sich mehrere Fluoreszenzsignale in einem Cluster gibt dieser Wert der entsprechenden Base eine niedrigere Qualität als wenn das Fluoreszenzsignal deutlich einer Base zugeordnet werden kann. Der Q-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit (P) der richtigen Base in einem logarithmischen Zusammenhang an, sodass ein Q-Wert von 10 einer Wahrscheinlichkeit von 90% und ein Q-Wert von 20 einer Wahrscheinlichkeit von 99% entspricht (Gleichung 1).

$$Q = -10 \log_{10} P \quad \text{Gleichung (1)}$$

In den Illumina-Daten wurden Sequenzen gefiltert, welche in der Insertregion mehr als drei Basen mit einem Qualitäts-Wert unter $Q = 18$ enthielten. Dies betraf zwischen 2,6% und 11,7% der Sequenzen für die verschiedenen Phagenbibliotheken (Tabelle 11; 4). Ein weiterer Schritt zum Filtern fehlerhafter Sequenzen betrifft die Art der Codons. Wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben werden für die Herstellung der Phagenbibliotheken ausschließlich NNK Codons verwendet, wobei N jeder der vier Nukleobasen und K entweder T oder G entspricht. Demnach sind Sequenzen, welche andere Codons enthalten, definitiv fehlerhaft. Aufgrund dessen wurden 0,8% bis 2,6% der Sequenzen mit falschen Codons aussortiert (Tabelle 11; 5). Darüber hinaus gibt es auch in den Illumina-Daten Sequenzen, welche von Wildtypphagen herrühren und kein Insert aufweisen. Die Anzahl dieser Sequenzen beträgt 10,9% bzw. 9,4% für die Bibliotheken der unbehandelten PP-Folie und ist damit geringer als in der initialen Phagenbibliothek, in welcher 13% Wildtypphagen auftreten (Tabelle 11; 6). Für die Corona-behandelte und die isotaktische PP-Folie ergibt sich eine leicht höhere Anzahl an Sequenzen ohne Insert von 14,2% bzw. 20,6%. Dies könnte darauf hindeuten, dass für diese Targets vermehrt unspezifische Bindungen der Phagen während des Biopannings auftraten. Davon ist hierbei jedoch nicht auszugehen, weil solche Sequenzen in den Illumina-Daten überrepräsentiert werden. Sequenzen ohne Insert sind naturgemäß kürzer und kürzere Sequenzen werden während der Clusteramplifizierung (Kapitel 2.6.1; Abb. 7) in einem Illumina-Gerät bevorzugt amplifiziert und dadurch häufiger sequenziert. Dieser Effekt kann

minimiert werden, indem kürzere DNA-Fragmente während der Probenvorbereitung vor der Extraktion aus dem Elektrophoresegel bestmöglich entfernt werden (Kapitel 3.4).

Tabelle 11. Übersicht der Illumina-Rohsequenzdaten für die verschiedenen Phagenbibliotheken und den Effekt der angewendeten Fehlerkorrekturen sowie die Zahl der resultierenden Peptidsequenzen.

	PP_{unbehandelt} 1. Runde	PP_{unbehandelt} 2. Runde	PP_{corona} 2. Runde	PP_{isotaktisch} 2. Runde
DNA-Reads (gesamt)	6.096.479	3.919.966	3.270.314	2.410.944
1) Keine flankierenden Sequenzen gefunden	831.095 (13,6%)	195.449 (5,0%)	285.777 (8,7%)	85.981 (3,6%)
2) Verbinden beider Reads nicht möglich	973.609 (16,0%)	354.897 (9,1%)	193.598 (5,9%)	220.428 (9,1%)
3) Falsche Peptidlänge	46.487 (0,8%)	5161 (0,1%)	2888 (0,1%)	2854 (0,1%)
4) Niedrige Q-Werte (>3 Basen mit Q<18)	713.770 (11,7%)	353.090 (9,0%)	108.369 (3,3%)	62.985 (2,6%)
5) Falsche Codons im Insert	51.986 (0,9%)	34.514 (2,6%)	24.800 (0,8%)	27.330 (1,1%)
6) Kein Insert gefunden	665.621 (10,9%)	367.187 (9,4%)	674.632 (20,6%)	342.693 (14,2%)
7) Korrektur ähnlicher Sequenzen	235	2064	1018	2247
Peptidsequenzen nach Bereinigung:				
Gesamtzahl	2.826.539	2.614.353	1.981.350	1.668.946
Verschiedene Sequenzen	1.654.324	74.375	187.079	8.660

Bei einer ersten Analyse der resultierenden Peptide treten sowohl stark angereicherte Sequenzen als auch weniger häufige Sequenzen auf, welche sich in nur einer Position voneinander unterscheiden. Dabei sind die weniger häufigen Sequenzen etwa um den Faktor 1000 seltener vorhanden. Ein Beispiel ist die häufigste Sequenz DYHDPSP~~L~~TLRK, welche nach der zweiten Runde mehr als 1,6 Mio. mal in der Bibliothek PP_{unb} vorliegt. Die häufigsten Sequenzen, welche sich in nur einer Position unterscheiden sind DYHDPSP~~L~~R~~L~~RK (1216x gefunden) und DYHDPSP~~L~~TL~~Q~~K (903x gefunden). Mit etwa um Faktor 1 Mio. geringeren Häufigkeiten finden sich Sequenzen mit zwei verschiedenen Positionen, beispielsweise DYHDPSP~~L~~TL~~Q~~M (18x gefunden) und DYHDPSP~~L~~PT~~M~~QK (9x gefunden). Dieser Effekt wurde bereits in anderen Next-Generation-Sequenzierungen von Phagenbibliotheken beobachtet und resultiert aus Sequenzierfehlern einer Größenordnung von etwa 0,1%, welche auch durch die bisher angewendeten Qualitätsfilter nicht vermieden werden konnten.^[90] Für alle Sequenzen die häufiger als 1500 mal in einem Datensatz vorkommen, wurden daher alle betreffenden Peptidsequenzen mit einer abweichenden Position zu der jeweils häufigen Sequenz korrigiert (Tabelle 11; 7). Für die Bibliotheken nach zwei Panning-Runden betrifft dies

aufgrund einer größeren Anreicherung mehr Sequenzen (1018 - 2247 korrigierte Sequenzen) als für die erste Runde (235 korrigierte Sequenzen).

Weil durch die angewendeten Qualitätsfilter und Korrekturen nicht alle fehlerhaften Sequenzen ausgeschlossen werden können, werden für die in den folgenden Kapiteln besprochene Auswertung hauptsächlich Sequenzen herangezogen, welche in Kopienzahlen von 10 oder mehr in einem Datensatz auftreten.

3.5 Illumina-Sequenzierung

3.5.1 Sequenzanalyse der PP-Target-Phagenbibliotheken

3.5.1.1 Sequenzpool nach der ersten Panning-Runde für PP_{unbehandelt}

Für einen ersten Überblick sollen zunächst die durch das beschriebene Programm erhaltenen Peptide für jede der sequenzierten Phagenbibliotheken bezüglich ihrer Diversität und der Art der Sequenzen ausgewertet werden.

Die Illumina-Sequenzierung der Phagenbibliothek der unbehandelten PP-Folie nach der ersten Panning-Runde lieferte insgesamt 2,8 Mio. Peptidsequenzen, darunter 1,6 Mio. verschiedene Sequenzen. In Abbildung 19 wird die hohe Diversität des Sequenzpools deutlich. Lediglich die häufigsten 15 Sequenzen kommen mehr als 1000-fach vor und machen damit nur 0,001% der gesamten Bibliothek aus. Die einfach bis vierfach vorkommenden Sequenzen bilden mit ca. 85% den Großteil des Sequenzpools, während die häufigsten tausend Sequenzen zusammengenommen nur 7% Prozent der gesamten Bibliothek entsprechen.

Bezüglich der häufigsten Peptidsequenzen in der Bibliothek wird eine starke Ähnlichkeit zu den durch die Sanger-Methode gefundenen Sequenzen deutlich. Fünf der ersten 20 Peptidsequenzen, darunter die häufigsten vier Sequenzen, sind bereits durch die Sanger-Sequenzierung bekannt. Die häufigste Sequenz DYHDSLPTLRK mit einer Kopienzahl von 15.107 nach der ersten Biopanning-Runde wurde über die Sanger-Methode nach der dritten Runde ebenfalls mehrfach gefunden (Kapitel 3.3.1). Die Sequenzen RDYHPRDHTATW und QVNLGERSQQM, welche mit Kopienzahlen von 12.797 und 7.362 für die unbehandelte PP-Folie auftreten und damit die zweit- und dritthäufigste Sequenz darstellen, sind in der Sanger-Sequenzierung jedoch ausschließlich für die Corona-behandelte und isotaktische PP-Folie selektiert worden. Dies legt nahe, dass die selektierten Phagenbibliotheken für die verschiedenen PP-Targets ähnlicher sind, als die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung vermuten lassen.

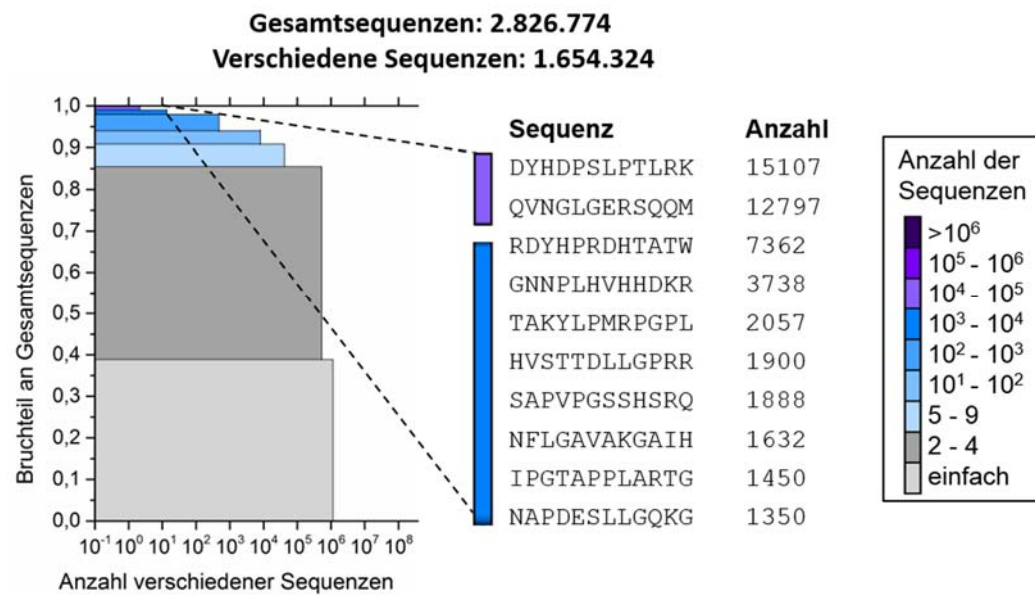


Abbildung 19. Diversität und häufigste Sequenzen der Phagenbibliothek für die unbehandelte PP-Folie nach der ersten Biopanning-Runde. 85% der Sequenzen treten in niedrigen Kopienzahlen (1-4) auf.

3.5.1.2 Sequenzpool nach der zweiten Panning-Runde für PP_{unbehandelt}

Nach der zweiten Panning-Runde ist eine starke Abnahme der Sequenz-Diversität zu beobachten. Mit 2,6 Mio. Peptidsequenzen ergab die Illumina-Sequenzierung ähnlich viele Sequenzen wie für die erste Runde (2,8 Mio.), davon unterscheiden sich jedoch nur 74.375 Sequenzen im Vergleich zu 1,6 Mio. nach der ersten Runde. Während der Großteil der Sequenzen weiterhin einfach vorliegt, wird die Abnahme der Diversität durch eine starke Anreicherung einiger weniger Sequenzen verursacht (Abbildung 20). Beispielsweise hat sich die Kopienzahl der häufigsten Sequenz DYHDSLPTLRK von 15.107 auf über 1,6 Mio. nach der zweiten Runde vervielfacht. Allein dieser Sequenz entsprechen dabei 61% der gesamten Bibliothek. Die 20 häufigsten Sequenzen bilden 82% der Gesamtbibliothek, wohingegen diese nach der ersten Runde nur einen Anteil von 2% besaßen. Die Art der häufigsten Sequenzen veränderte sich von der ersten zur zweiten Runde kaum. Beispielsweise sind die häufigsten fünf Sequenzen für beide Datensätze identisch. Die 11.660-fach gefundene Sequenz VCSPCGVPPAK ist bereits aus der Sanger-Sequenzierung der dritten Runde bekannt und ist die häufigste Sequenz, welche die seltene Aminosäure Cystein aufweist. Werden die Kopienzahlen der häufigsten Sequenzen beider Bibliotheken verglichen, ergeben sich teilweise deutlich verschiedene Anreicherungsraten. Während die häufigste Sequenz DYHDSLPTLRK um das 106-fache angereichert wird, ergibt sich für die zweithäufigste Sequenz der ersten Runde QVNLGERSQQM lediglich eine 7,8-fache Anreicherung. Mit hoher

Wahrscheinlichkeit ist die starke Anreicherung der häufigsten Sequenz nicht allein durch eine hohe Affinität zum Target zu erklären, sondern das Resultat höherer Amplifizierungsraten.

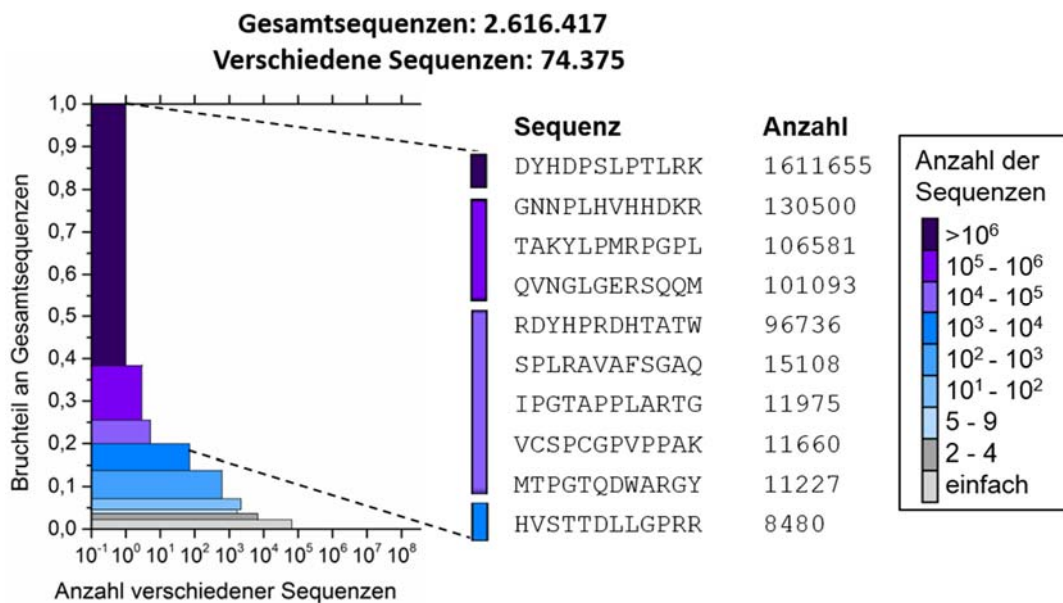


Abbildung 20. Diversität und häufigste Sequenzen der Phagenbibliothek für die unbehandelte PP-Folie nach der zweiten Biopanning-Runde. Die Bibliothek wird durch die häufigste Sequenz dominiert.

3.5.1.3 Sequenzpool nach der zweiten Panning-Runde für PP_{corona}

Für die Corona-behandelte PP-Folie wurden 1,98 Mio. Peptidsequenzen, darunter 187.079 verschiedene Sequenzen, erhalten. Im Vergleich zur unbehandelten PP-Folie weist die Sequenzbibliothek nach zwei Runden eine höhere Diversität auf (Abbildung 21). Während für PP_{unb} nur 2,8% verschiedene Sequenzen bezogen auf den gesamten Sequenzpool erhalten werden, sind es für PP_{cor} 9,4%. Zwar ist der Anteil der einfach vorkommenden Sequenzen mit 35% im Vergleich zur unbehandelten Folie (85%) bezogen auf die verschiedenen Sequenzen deutlich geringer, jedoch ist eine weniger starke Anreicherung der häufigsten Sequenzen zu beobachten. Die häufigsten 20 Sequenzen haben mit 44% verglichen mit der unbehandelten PP-Folie einen nur halb so hohen Anteil an der Gesamtbibliothek. Ein deutlich größerer Teil der Sequenzen liegt in Kopienzahlen von 10 bis 1000 vor.

Durch die Corona-Behandlung dieser Folienseite weist die Oberfläche eine höhere Polarität auf. Diese wird insbesondere durch sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen wie Alkohole und Carbonyl- oder Carboxylgruppen verursacht (siehe Kapitel 3.1), welche potentielle Bindungsstellen für die Phagenklone darstellen. Somit kann die größere Diversität der sequenzierten Phagenbibliothek auf die höhere Zahl verfügbarer Bindungsstellen auf der PP-

Oberfläche zurückgeführt werden. Das vermehrte Auftreten von Sequenzen mit Kopienzahlen von 10 bis 1000 ist möglicherweise ebenfalls hierdurch verursacht.

Bezüglich der Art der stark angereicherten Sequenzen ist eine hohe Übereinstimmung mit der unbehandelten PP-Folienseite festzustellen, wobei die fünf häufigsten Sequenzen identisch sind. Die Sequenz DYHDPSLPTLRK ist auch in dieser Bibliothek mit einer Kopienzahl von über einer halben Million die mit Abstand am häufigsten auftretende Sequenz und besitzt einen Anteil von 27% am gesamten Datensatz. Dies legt zunächst eine hohe Ähnlichkeit beider Sequenzpools nahe. Der Amplifizierungsvorteil einiger weniger Sequenzen wirkt jedoch unabhängig vom verwendeten Substrat in gleichem Maße in jeder Phagenbibliothek. Es ist daher nicht überraschend, unter den häufigsten Sequenzen für beide Oberflächen identische Phagenklone zu selektieren.

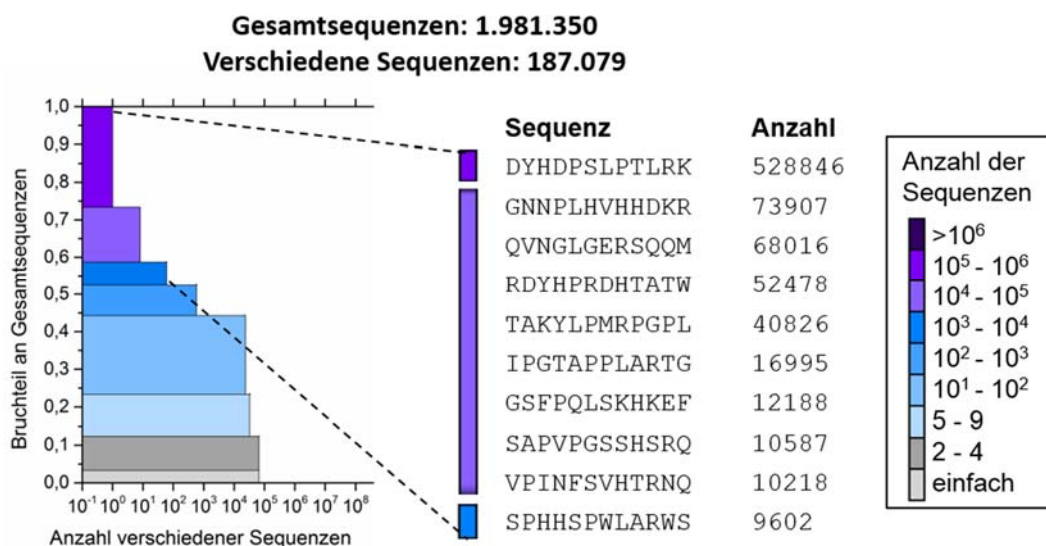


Abbildung 21. Diversität und häufigste Sequenzen der Phagenbibliothek für die Corona-behandelte PP-Folie nach der zweiten Biopanning-Runde. Im Vergleich zu PP_{unb} liegt eine höhere Diversität vor.

3.5.1.4 Sequenzpool nach der zweiten Panning-Runde für PP_{isotaktisch}

Die Illumina-Sequenzierung der Phagenbibliothek der isotaktischen PP-Folie ergab 1,7 Mio. Peptidsequenzen, darunter jedoch nur 8660 verschiedene Sequenzen. Das bedeutet, dass lediglich 0,5% verschiedene Sequenzen bezogen auf die Gesamtbibliothek erhalten wurden (PP_{unb}: 2,8%; PP_{cor}: 9,4%). Im Vergleich zu den weiteren Phagenbibliotheken liegt ein deutlich größerer Anteil an Sequenzen mit Kopienzahlen zwischen 100 und 10.000 vor, welche 40% der gesamten Bibliothek entsprechen. Der Anteil der einfach vorkommenden Sequenzen ist mit weniger als einem Prozent sehr gering (Abbildung 22).

Weiterhin ist die Diversität dieser Phagenbibliothek ebenfalls sehr gering. Die häufigsten 1000 Sequenzen entsprechen 97% der Gesamtbibliothek. Einige wenige Sequenzen sind stark angereichert und die Sequenz DYHDPSSLPTLRK ist mit einem Anteil von 50% an der Gesamtbibliothek erneut die häufigste Sequenz. Die Art der häufigsten Sequenzen ist den anderen Datensätzen ähnlich, wobei die drei Sequenzen mit den höchsten Kopienzahlen für alle Bibliotheken der zweiten Biopanning-Runde identisch sind. Darüber hinaus treten die häufigsten 20 Sequenzen ebenfalls in der Bibliothek der unbehandelten PP-Folie auf, wenn auch mit zum Teil deutlich geringeren Kopienzahlen.

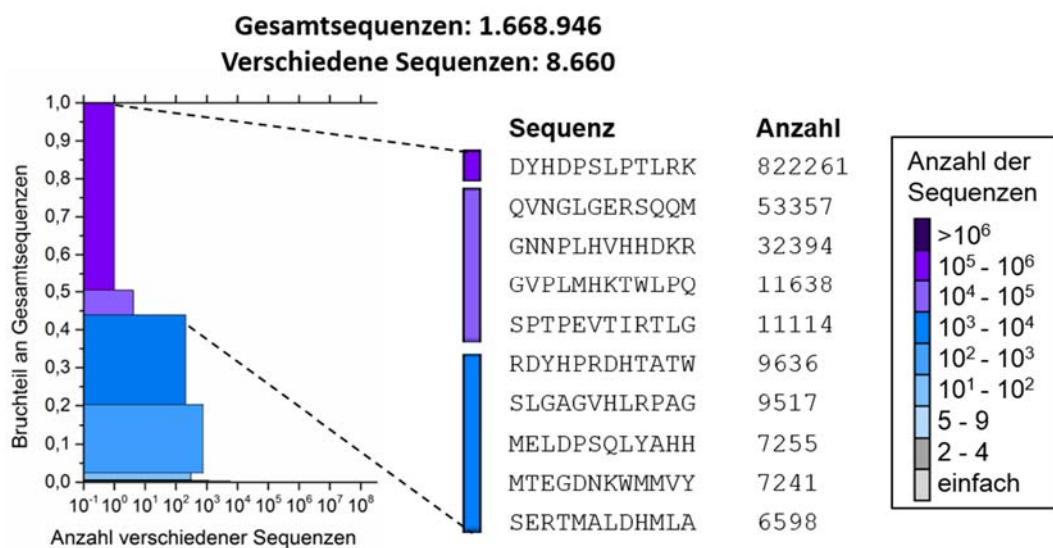


Abbildung 22. Diversität und häufigste Sequenzen der Phagenbibliothek für die isotaktische PP-Folie nach der zweiten Biopanning-Runde. Häufig treten Sequenzen mit Kopienzahlen von 10^1 - 10^3 auf.

Zusammenfassend betrachtet, weisen die Screenings der verschiedenen PP-Substrate nach der zweiten Panning-Runde ähnliche Tendenzen bezüglich der geringen Diversität und starken Anreicherung der häufigsten Sequenzen auf. Die Phagenbibliothek PP_{iso} unterscheidet sich jedoch stärker von PP_{unb} und PP_{cor} als diese untereinander. Insbesondere wird eine deutlich geringere Anzahl Sequenzen für PP_{iso} erhalten. Erklärbar sind die Unterschiede durch die verschiedenen Herstellungsarten und Ausgangsmaterialien der Folien. Während die Phagenbibliotheken PP_{unb} und PP_{cor} aus Screenings auf beiden Seiten der gleichen PP-Folie resultieren, wurde die isotaktische PP-Folie separat angefertigt. Die Herstellung erfolgte in einer Polymerpresse, wobei trotz des sehr reinen Ausgangsmaterials Anteile von Sauerstoff, Stickstoff und Silicium sowie Spuren von Calcium und Aluminium auf der Oberfläche nachgewiesen wurden (Kapitel 3.1). Somit weist die PP_{iso}-Oberfläche im Vergleich zur technischen PP-Folie einen eher heterogenen Charakter auf, welcher die Unterschiede der resultierenden Phagenbibliotheken erklären kann. Zusätzlich steht den Phagen während des

Biopannings auf der isotaktischen PP-Folie aufgrund der geringen Probengröße eine geringere Oberfläche zur Verfügung, welche als limitierender Faktor auf die Zahl der bindenden Phagen wirken kann.

Ein Abgleich der häufigsten Sequenzen jedes Datensatzes mit der Mimo-Datenbank^[102] liefert zusätzlich zu den bereits durch Sanger-Sequenzierung bekannten Sequenzen eine Reihe weiterer Übereinstimmungen. Beispielsweise wurden die Peptide SPLRAVAFSGAQ (PP_{unb}, 2. Runde, 6. Platz) und SAPVPGSSHSRQ (PP_{cor}, 2. Runde, 8. Platz), welche beide mit Kopienzahlen von über 10.000 beim Screening auf den verschiedenen PP-Oberflächen selektiert wurden, bereits in früheren Arbeiten bei Phagendisplay-Experimenten mit Antikörpern gefunden.^[103b, 110] Weiterhin werden in allen Datensätzen bestimmte Effekte, wie beispielsweise die Anreicherung von Prolin oder die Unterdrückung von Cystein, beobachtet, welche in Phagendisplay-Experimenten bereits bekannt sind. Sowohl das Auffinden gleicher Sequenzen für sehr verschiedene Targets als auch die Anreicherung bestimmter Aminosäuren könnte auf Amplifizierungsvorteile bzw. Nachteile bestimmter Phagen hindeuten.^[93] Hierbei wird ein Vorteil der Illumina-Sequenzierung vollständiger Phagenbibliotheken gegenüber der Sanger-Sequenzierung einzelner Klone deutlich. Eine im folgenden Kapitel erläuterte Untersuchung der Amplifizierungstendenzen bestimmter stark angereicherter Sequenzen ermöglicht es, diese von den Effekten der Target-Bindung zu unterscheiden. Hierfür wurden zusätzlich Referenzphagenbibliotheken mit der Illumina-Methode sequenziert, welche nicht für das Biopanning verwendet wurden und keinem PP-Target ausgesetzt waren. Dieses Experiment soll Aufschluss darüber geben, inwiefern sich bestimmte Sequenzen oder Aminosäuren auch ohne Targetbindung, allein durch die Amplifizierung in *E. coli*, anreichern.

3.5.2 Sequenzanalyse originaler Phagenbibliotheken als Referenz

Unter Anbetracht der Amplifizierungsvorteile einiger Sequenzen und der Präferenz für bestimmte Aminosäuren scheint die Sequenzierung von Referenzphagenbibliotheken notwendig, um falschpositive Sequenzen zu minimieren. In der Literatur sind bereits Sequenzierungen von originalen Ph.D.-12 Phagenbibliotheken beschrieben, jedoch wurden die Phagen vom Hersteller NEB in 16+ Chargen produziert, die untereinander nicht vergleichbar sind. Bei Betrachtung des tatsächlichen Sequenzraumes von 10^9 Sequenzen in einer Phagenbibliothek, wird offensichtlich, dass bei theoretisch möglichen 4×10^{21} ($=12^{20}$) 12-mer Sequenzen nur ein Bruchteil der Möglichkeiten enthalten ist. Zwei unabhängig voneinander produzierte Chargen weisen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit kaum

Überschneidungen des Sequenzraumes auf. Die ausführlichste Studie zur Sequenzierung von originalen Phagenbibliotheken, in welcher hauptsächlich die Ph.D.-7-Bibliothek (NEB) vom initialen Zustand bis zur dritten Amplifizierung untersucht wurde, stammt aus dem Jahr 2014 von Derda et al.^[93] Diese Studie kann jedoch nicht als Referenz für die im Rahmen dieser Arbeit besprochenen NGS-Daten dienen, da nur unzureichend Daten für die Ph.D.-12-Bibliothek existieren und die von Derda et al. untersuchten Phagenbibliotheken aus einer früheren Charge stammen. Beispielsweise finden sich keine der 20 am stärksten angereicherten 12-mer-Sequenzen der Derda Studie in den gesamten in der vorliegenden Arbeit besprochenen Sequenzdaten. Aus diesem Grund wurde die Sequenzierung von Referenzbibliotheken für diese Arbeit ebenfalls durchgeführt.

Tabelle 12. Übersicht der Illumina-Sequenzdaten für die verschiedenen Referenzphagenbibliotheken.

	Initiale Bibliothek	Amplifizierte Bibliothek
DNA Reads (gesamt)	12.739.067	14.413.000
Fehlerhafte Reads	4.079.591 (32,0%)	4.520.119 (31,3%)
Peptidsequenzen (gesamt)	8.659.476	9.892.881
Peptidsequenzen (verschieden)	4.574.988	5.007.741

Für das Referenzexperiment wurden 10% der verwendeten Ph.D.-12-Phagenbibliothek (Charge 14, lot# 0351501) des Herstellers *New England Biolabs* (NEB) im initialen Zustand sowie nach einmaliger Amplifizierung verwendet. Die Amplifizierung der Phagen in *E. coli* wurde dabei unter den gleichen Bedingungen wie für die Targetphagenbibliotheken nach dem Biopanning durchgeführt. Insgesamt lieferte die Illumina-Sequenzierung 12,7 bzw. 14,4 Mio. DNA-Reads, welche ähnlich den Targetbibliotheken zu etwa 70% in die entsprechenden Peptidsequenzen übersetzt werden konnten (Tabelle 12). Die in Kapitel 3.4.1 erläuterten Fehlerkorrekturen wurden auch für diese Datensätze angewandt.

Für die initiale Bibliothek sind theoretisch 10^9 Sequenzen in gleichen Häufigkeiten zu erwarten, das bedeutet, dass bei einem Ausschnitt von 10 Mio. untersuchten Sequenzen ($10^7/10^9 = 0,01$) über 99% der Sequenzen einfach vorkommen müssten. Die tatsächlichen Häufigkeiten weichen jedoch stark von der theoretischen Erwartung ab. Lediglich 63% der Phagenklone (bezogen auf verschiedene Sequenzen) treten einfach auf und bezogen auf die Gesamtbibliothek machen die einfach vorkommenden Sequenzen sogar nur etwa ein Drittel aus. Bereits in der initialen Phagenbibliothek weisen 2,1% der Sequenzen Kopienzahlen von über 1000 auf (Abbildung 23). Die drei häufigsten Sequenzen der initialen Bibliothek sind sowohl identisch mit den Illumina-Daten als auch den Sanger-Sequenzdaten für die PP-Targets. Mit einer Kopienzahl von 20.096 ist die häufigste Sequenz QVNLGERSQQM bereits

in der initialen Bibliothek stark angereichert. Auch die in den Target-Bibliotheken am häufigsten gefundene Sequenz DYHDSLPTLRK, befindet sich mit einer Kopienzahl von 2511 unter den ersten 15 Sequenzen.

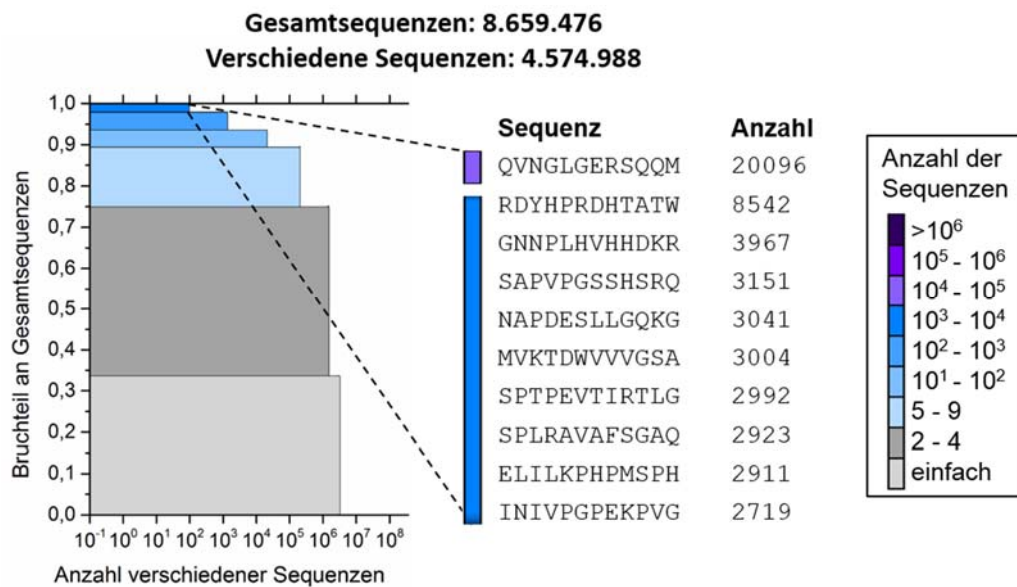


Abbildung 23. Diversität und Sequenzen der *Ph.D.-12* Referenzphagenbibliothek des Herstellers *New England Biolabs* (NEB) im initialen Zustand (Charge 14, lot# 0351501). Der Großteil der Sequenzen weist niedrige Kopienzahlen auf. Die Diversität der initialen Bibliothek ist jedoch deutlich geringer, als theoretisch zu erwarten wäre. Verursacht wird dies durch die hohe Anreicherung einiger Sequenzen.

Nach einer Amplifizierung in *E. coli* sind bezüglich der Populationen mit niedrigen Kopienzahlen nur minimale Änderungen sichtbar. Bezüglich der häufigen Sequenzen ist dagegen ein Anstieg der Kopienzahlen zu beobachten, jedoch nicht in gleicher Höhe. Die Kopienzahl von DYHDSLPTLRK steigt etwa um das Dreifache auf 7137, während sich andere Sequenzen wie QVNLGERSQQM nur minimal weiter anreichern (Abbildung 24). Diese stark angereicherten Sequenzen treten demnach mit großer Häufigkeit in der Phagenbibliothek auf, unabhängig davon ob diese im Biopanning einem Target ausgesetzt war oder nicht. Es ist daher nicht überraschend, dass einige dieser Sequenzen wie in Kapitel 3.3.1 und 3.5.1 beschrieben, bereits in Phagendisplay-Experimenten mit anderen Targets, wie Antikörpern, selektiert wurden.

Die beobachtete Anreicherung einiger sogenannter parasitärer Sequenzen in der initialen Bibliothek wurde auch von Derda et al. für Phagen einer früheren Charge beschrieben und scheint typisch für eine Phagenbibliothek zu sein.^[93] Der Grund für die Anreicherung ist oft unabhängig von der zufälligen 12-mer Sequenz.^[105a] Beispielsweise wurde bei vielen Experimenten, bei welchen die *Ph.D.-7*-Phagenbibliothek verwendet wurde, die Sequenz HAIYPRH selektiert.^[111] Es stellte sich heraus, dass der Phagenklon, welcher diese Sequenz

präsentiert, eine Punktmutation in einem untranslatierten, also nicht für ein Protein-codierenden Bereich der DNA enthält.^[112] Die Mutation befindet sich in einem Abschnitt, welcher für die Erkennung des bakteriellen Ribosoms zuständig ist und damit die Proteinsynthese einleitet. Die Punktmutation führt zu einer besseren Erkennung durch das Ribosom und damit zu einer beschleunigten Synthese eines der Phagenproteine. Es wurde gezeigt, dass modifizierte Wildtypklone mit der Sequenz HAIYPRH, welche diese Punktmutation nicht aufwiesen, keinen Amplifizierungsvorteil besitzen. Für einige weitere stark angereicherte Phagenklone früherer Chargen wurden ähnliche Mutationen gefunden, für andere Sequenzen bleibt die Ursache für den Amplifizierungsvorteil unbekannt.^[105a] Weiterhin wurde in vielen Studien die Bindung dieser schnell-amplifizierenden Sequenzen zum jeweiligen Target, beispielsweise durch ELISA-Assays, verifiziert. Daraus kann geschlossen werden, dass solche Phagenklone selektiert werden, weil sie sowohl einen Amplifizierungsvorteil, als auch eine Affinität zum Target aufweisen.

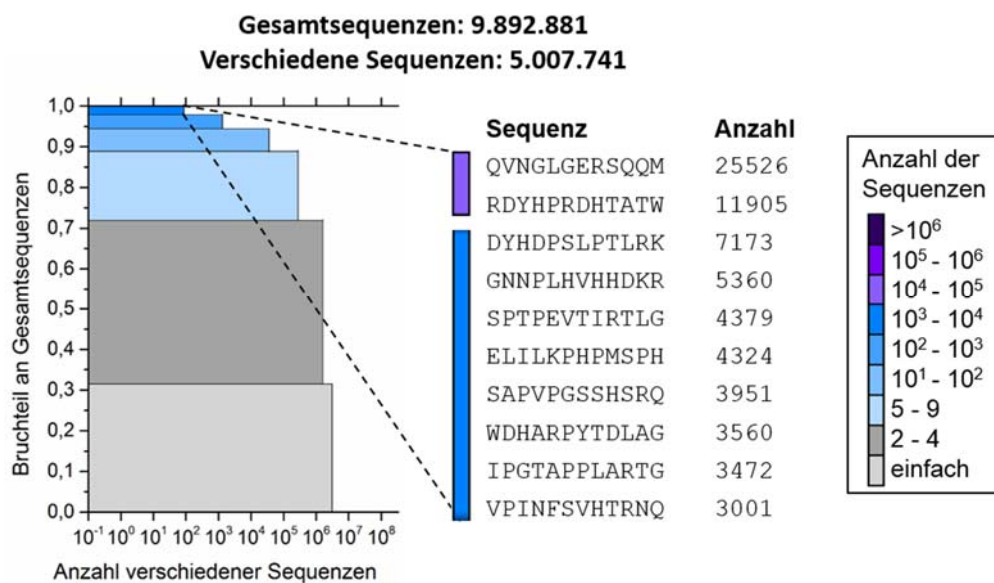


Abbildung 24. Diversität und Sequenzen der *Ph.D.-12* Referenzphagenbibliothek (Charge 14, lot# 0351501) nach einer Amplifizierung in *E. coli*. Nach einem Amplifizierungsschritt ist eine zusätzliche Anreicherung der häufigsten Sequenzen zu beobachten.

Durch die Amplifizierung der Ursprungsphagenbibliothek verändert sich deren Aminosäurezusammensetzung kaum (Abbildung 25). Lediglich die 100 häufigsten Sequenzen weisen leichte Tendenzen zu Prolin, Isoleucin, Phenylalanin und Tryptophan auf, während Serin und Threonin unterdrückt werden. Festzustellen ist jedoch eine teilweise deutliche Abweichung zu den Angaben des Herstellers NEB, die sich auf eigene NGS-Daten der entsprechenden Charge (Lot14) beziehen (Kapitel 6.1.1 Tabelle 23). Beispielsweise ist der

Anteil von Cystein sowie Leucin an der Bibliothek mit 1,4% bzw. 8,5% höher angegeben als im Rahmen dieser Arbeit durch Illumina-Sequenzierung ermittelt wurde (0,9% bzw. 7,8%). Zur Auswertung der Aminosäurezusammensetzung aller PP-Phagenbibliotheken wird daher die in dieser Arbeit sequenzierte amplifizierte Referenzbibliothek verwendet. Zur Vergleichbarkeit wurden auch die Sanger-Sequenzdaten mit Hilfe dieser Phagenbibliothek ausgewertet.

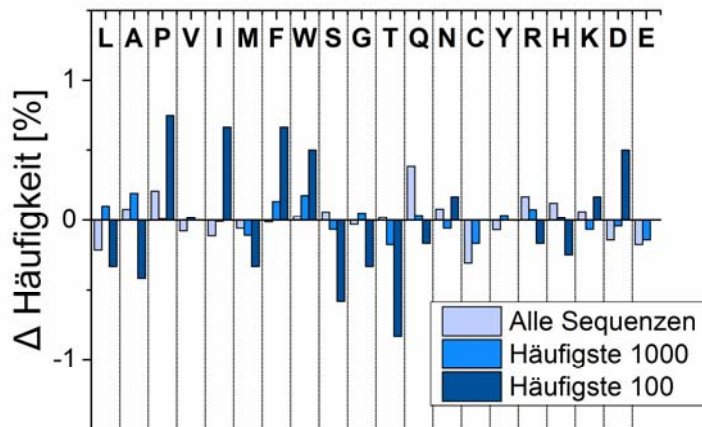


Abbildung 25. Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung der Peptidsequenzen mit Amplifizierungsvorteilen. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren nach einer Amplifizierung in *E. coli* im Vergleich zur initialen Phagenbibliothek.

Weiterhin wurde der Einfluss der Amplifizierung auf die einzelnen Aminosäuren bestimmter Positionen der 12-mer-Sequenz untersucht (Abbildung 26). Die stärksten Effekte wurden für die erste Position beobachtet, welche sich am N-terminalen Ende der randomisierten Sequenz und des gesamten pIII-Proteins befindet. Ein bereits bekannter Positionseffekt ist die vollständige Unterdrückung von Prolin an dieser Stelle. Prolin wirkt dort als Inhibitor auf die Signalpeptidase, ein Enzym in *E. coli*, welches für die Amplifizierung notwendig ist.^[74]

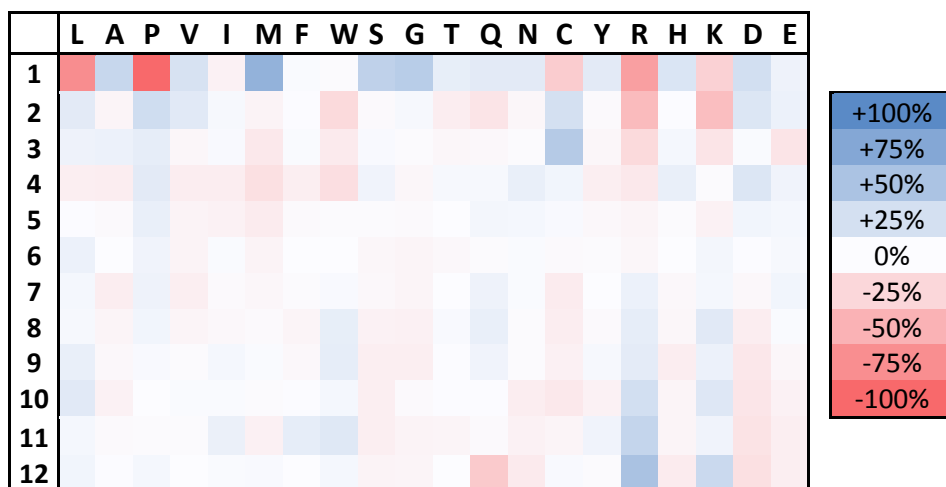





Abbildung 26. Untersuchung der Positionseffekte der Peptidsequenzen mit Amplifizierungsvorteilen. Dargestellt ist die positionsabhängige Aminosäurezusammensetzung der amplifizierten Referenzphagenbibliothek bezogen auf das durchschnittliche Vorkommen der Aminosäuren in jeder der 12 Positionen für alle Peptide mit einer Kopienzahl ≥ 10 .

Die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sind ebenfalls am N-terminalen Ende der Sequenz unterdrückt, da zu viele positive Ladungen den Transport des neu synthetisierten pIII-Proteins durch die innere Membran der *E. coli* erschweren.^[74] Der gegenteilige Effekt ist für die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure zu beobachten. Darüber hinaus ist eine starke Anreicherung von Methionin sowie Glycin, Serin und Alanin und eine Unterdrückung von Leucin in der ersten Position sichtbar, welche in bisherigen Studien nicht auftraten, wahrscheinlich jedoch ebenfalls auf proteolytische Präferenzen der Signalpeptidase zurückzuführen sind.^[74, 113] Die leichte Anreicherung der seltenen Aminosäure Tryptophan im C-terminalen Teil der Peptidsequenz wurde bereits beschrieben, konnte aber bisher nicht erklärt werden.^[113]

Tabelle 13. Analyse gemeinsamer Motive der Peptidsequenzen mit Amplifizierungsvorteilen durch den MEME-Algorithmus. Dargestellt sind wiederkehrende Motive unter den häufigsten 1000 Sequenzen der amplifizierten Referenzbibliothek. Bedingungen des MEME-Scans: Motivbreite: 2-12; Mindestzahl Sequenzen mit Motiv: 2.^[91]

	Motiv	Anzahl	Breite
1.		10	4
2.		9	6
3.		7	2

Im nächsten Schritt wurden die häufigsten 1000 Sequenzen der einmal amplifizierten Referenzbibliothek mit Hilfe des MEME-Programms (Multiple Em for Motif Elicitation)^[91] auf gemeinsame Motive untersucht, die sich allein durch die Amplifizierung anreichern. Die erhaltenen Motive sind in Tabelle 13 dargestellt und zeigen ausschließlich Dicysteinsequenzen. Es ist bereits bekannt, dass in Phagendisplay-Experimenten kaum Sequenzen mit einer ungeraden Anzahl Cysteinen auftreten, wodurch Cystein im Allgemeinen unterdrückt wird. Für 1000 Sequenzen wären aufgrund der Codonhäufigkeit theoretisch 375 Cysteine zu erwarten.^[74] Tatsächlich finden sich in der amplifizierten Bibliothek unter den häufigsten 1000 Sequenzen lediglich 56 Cystein-haltige Sequenzen, wovon 45 Sequenzen jeweils zwei Cysteine enthalten. Meist befinden sich beide Cysteinreste in direkter Nachbarschaft oder getrennt durch zwei bzw. vier zufällige Aminosäuren. Es wird vermutet, dass einzelne Cysteine in der randomisierten Sequenz Disulfidbindungen zu einem der

Cysteinreste in der nativen pIII-Proteinsequenz ausbilden. Dies würde die Inaktivität des pIII-Proteins bewirken, welches für die Infektion von *E. coli* zuständig ist.^[74] Durch die dementsprechend starke Selektion gegen Sequenzen mit einer ungeraden Anzahl an Cystein werden die Dicysteinsequenzen vom MEME-Algorithmus als Motive erkannt. Abgesehen von den gezeigten Dicysteinen konnte keine Anreicherung weiterer Motive festgestellt werden. Diese Daten weisen, wie frühere Studien, darauf hin, dass die Amplifizierung der Phagen in *E. coli* keine bestimmten Sequenzmotive anreichert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bereits in der initialen Phagenbibliothek eine deutlich geringere Diversität vorliegt, als theoretisch zu erwarten wäre. Einige Sequenzen treten in sehr hohen Kopienzahlen auf und werden nach einer Amplifizierung ohne Kontakt zu einem Target weiter angereichert. Diese Anreicherung ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf Mutationen im Genom der Phagenklone und nicht auf die Art der präsentierten 12-mer Sequenz zurückzuführen. Zusätzlich liegt insbesondere für die N-terminale Position eine Selektion gegen bestimmte Aminosäuren, sowie eine starke Selektion gegen Peptide mit ungerader Cystein-Anzahl vor. Im Folgenden wurden die gewonnenen Ergebnisse verwendet, um das entwickelte Programm zur Sequenzdatenauswertung zu erweitern und Amplifizierungseffekte zu eliminieren.

3.5.3 Normierung der PP-Phagenbibliotheken anhand der Referenzexperimente

3.5.3.1 Hintergrundkorrektur zur Eliminierung der Amplifizierungstendenzen

Die im vorigen Kapitel beschriebenen Referenzbibliotheken wurden zur Identifizierung der Sequenzen mit Amplifizierungsvorteilen sowie zur Normierung der Aminosäurezusammensetzung verwendet. Dafür wurden im ersten Ansatz in den Datensätzen der PP-Folien alle Sequenzen eliminiert, welche in der einmal amplifizierten Referenzbibliothek in einer Kopienzahl von über 100 auftreten. Dieser Ansatz wird im Folgenden als Hintergrundkorrektur bezeichnet. Dies entspricht theoretisch 1371 Sequenzen des insgesamt fünf Millionen umfassenden Referenzdatensatzes, wovon tatsächlich 1342, 1258 und 225 Sequenzen für die unbehandelte, Corona-behandelte- und isotaktische PP-Folie entfernt wurden. Unter den entfernten Peptidsequenzen befinden sich jeweils die neun (PP_{cor} , PP_{iso}) bzw. zwölf (PP_{unb}) am stärksten angereicherten Sequenzen jedes Datensatzes. Ein Abgleich der verbliebenen häufigsten Sequenzen mit der Mimo-Datenbank ergibt keine Übereinstimmung. Dies bedeutet, dass keine dieser Sequenzen bisher in anderen Phagendisplay-Experimenten

gefunden wurde und ist ein Hinweis darauf, dass die bevorzugt amplifizierten Klone erfolgreich eliminiert wurden.

Tabelle 14. Häufigste Sequenzen der Phagenbibliotheken nach der zweiten Panning-Runde mit Hintergrundkorrektur (Sequenzen mit einer Kopienzahl über 100 in der Referenzphagenbibliothek eliminiert). Unterstrichene Sequenzen befinden sich jeweils für beide Datensätze (PP_{unb} und PP_{cor}) unter den ersten 15 Sequenzen. Fett gedruckte Sequenzen treten jeweils nur in einem Datensatz auf; Aminosäureklassen (basisch, sauer, hydrophob, polar) farblich unterschieden.

PP _{unbehandelt} (1342 Sequenzen eliminiert)	PP _{corona} (1258 Sequenzen eliminiert)	PP _{isotaktisch} (225 Sequenzen eliminiert)
8480 HVSTTDLLGPRR	4856 HVSTTDLLGPRR	5783 HEPKNNWITPPN
3805 NFLGAVAKGAIH	4279 QLTSFHPKGHRV	4504 YDGRLTGHRAAQ
2706 <u>SSEANSHRWLRH</u>	2426 NFLGAVAKGAIH	3900 <u>DPLLWLHEKSLR</u>
2385 QLTSFHPKGHRV	1379 IGSGRYLENTIG	3891 SPGAYFLNQPSR
1564 AVPPLANLSGVR	1294 AVPPLANLSGVR	3394 VPPPEAYDGVLH
1203 APGRSHIQHSLH	1139 YQSAPVKHPHMK	3345 <u>HPFVHHKFNRLS</u>
914 EAYPKSNFFLGA	854 <u>NSVASLRVLGYM</u>	3114 GTSPSWNSAVLF
712 <u>THIRPTEIRHTF</u>	666 VGTSTQYGKKMS	3024 GSWRVPGEYNHM
695 IGSGRYLENTIG	644 <u>TPGPVSPKTIRS</u>	2830 <u>TPPHAASYMSQR</u>
589 TPSHEIYNPNV	608 APGGSKLLGHRL	2686 QIVTSWPPAERN
555 KVYHEGLSMKKH	564 GTQPVSTQVRLW	2681 <u>FPYVAAPHVASR</u>
470 HVNKFSGVGPAL	535 QPHSQVYKFRAA	2502 <u>DRLAWHGETHRY</u>
457 <u>DISLHSGFGGTH</u>	499 <u>AVGVRNGSFMLP</u>	2394 <u>AARFDSNSFYHS</u>
441 MNPKNPFS _D WSR	498 <u>DWSWNRVYPLTT</u>	2339 <u>HANSHQAPSSVS</u>
436 <u>TNLKEPYKPSGH</u>	478 <u>SEGLAKDPKVRW</u>	2329 QQLYLGNSNSYR

Bei Betrachtung der häufigsten 15 Sequenzen nach Hintergrundkorrektur sind Ähnlichkeiten vor allem im Vergleich von PP_{unb} und PP_{cor} sichtbar (Tabelle 14). Die häufigste Sequenz HVSTTDLLGPRR, welche Vertreter aller Aminosäureklassen enthält, ist für beide Datensätze identisch. Unter den häufigsten 15 Sequenzen treten lediglich drei (PP_{unb}) bzw. fünf Sequenzen (PP_{cor}) ausschließlich in einem der drei Datensätze auf. Der Sequenzpool für PP_{iso} unterscheidet sich stärker von den weiteren Datensätzen. Dies ist durch die vergleichsweise heterogene Oberfläche von PP_{iso} sowie die geringere Probengröße und damit einhergehende reduzierte Anzahl an Waschschritten während des Biopannings erklärbar (Kapitel 3.1). Unter den häufigsten 15 PP_{iso}-Sequenzen treten sieben Sequenzen ausschließlich in diesem Datensatz auf. Die übrigen Sequenzen besitzen darüber hinaus in den PP_{unb/cor}-Datensätzen deutlich geringere Kopienzahlen. Unter den für PP_{iso} einzigartigen Sequenzen sind vor allem Histidin und Alanin angereichert. Beispielsweise enthalten drei der sieben einzigartigen Sequenzen für PP_{iso} ein Alanindipeptid. Alanin ist in der Lage über hydrophobe Wechselwirkungen zur Bindung der Peptide auf PP beizutragen. Histidin ist bekannt dafür eine Reihe von Metallen mit hoher Affinität über das freie Elektronenpaar am Imidazolring zu

binden.^[114] Unter anderem bildet Histidin Komplexe mit Ca^{2+} -Ionen^[115], wobei Calcium auf der isotaktischen PP-Folie nachgewiesen wurde. Darüber hinaus ermöglicht Histidin eine Reihe weiterer Bindungen wie Kationen- π - oder π - π -Wechselwirkungen.^[115]

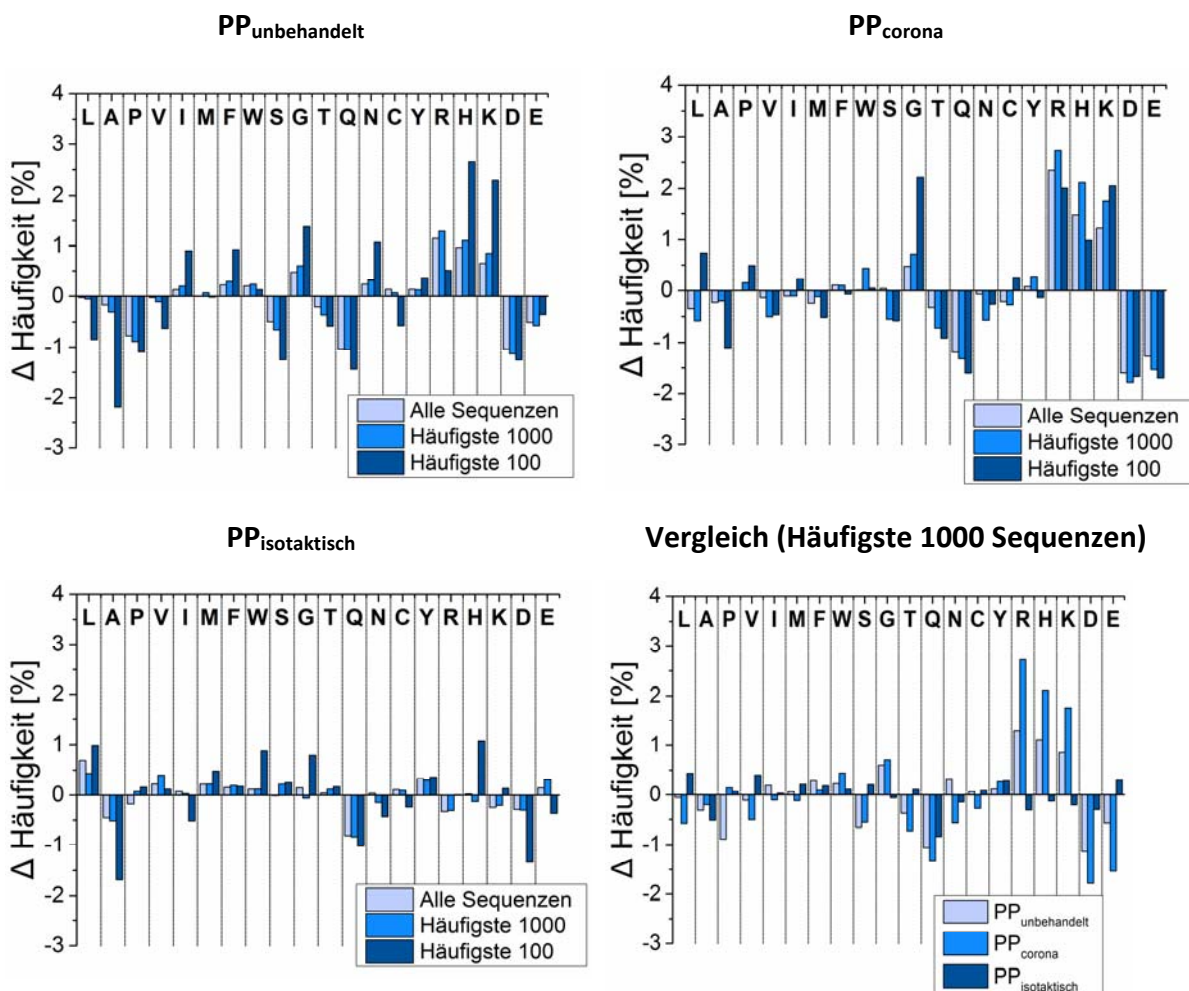


Abbildung 27. Untersuchung der Aminosäurehäufigkeit der 12-mer Peptide in den Illumina-Sequenzpools. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren im Vergleich zur einfach amplifizierten Referenzbibliothek für alle Peptide nach der zweiten Panning-Runde mit einer Kopienzahl ≥ 10 und Hintergrundkorrektur (Sequenzen mit einer Kopienzahl über 100 in der Referenzphagenbibliothek eliminiert).

Wird nun die Aminosäurezusammensetzung aller Sequenzen der Hintergrund-bereinigten Datensätze betrachtet und mit der amplifizierten Referenzbibliothek verglichen ist immer noch eine große Ähnlichkeit zwischen dem Sequenzpool der unbehandelten und Corona-behandelten PP-Folie im Vergleich zur isotaktischen PP-Folie zu beobachten (Abbildung 27). Für die unbehandelte PP-Folie sind die basischen Aminosäuren, insbesondere Histidin und Lysin unter den häufigsten 100 Sequenzen angereichert. Beide saure Aminosäuren werden dagegen unterdrückt, wobei die gleichen Trends für PP_{cor} beobachtet werden. Für die isotaktische PP-Folie sind diese Effekte lediglich bzgl. Histidin und Asparaginsäure unter den

häufigsten Sequenzen sichtbar. Basische Aminosäuren sind in der ionisierten Form als Kationen in der Lage Wechselwirkungen mit einer negativ geladenen Oberfläche oder auch π -Systemen auszubilden. Der Nachweis von sp^2 -hybridisiertem Kohlenstoff auf den Oberflächen PP_{cor} und PP_{unb} könnte eventuell auf die Präsenz von Kationen- π -Wechselwirkungen hindeuten (Kapitel 3.1). Hierzu ist anzumerken, dass für diese Art der Wechselwirkung nicht zwangsläufig aromatische π -Systeme nötig sind, da auch einfache lineare π -Systeme wie Ethylen mit Kationen interagieren. Die Bindungsenergien bei Wechselwirkungen mit Kationen liegen für lineare π -Systeme jedoch deutlich unterhalb der aromatischen π -Systeme (80,8 kJ/mol für NH_4^+ /Benzol und 42,8 kJ/mol für NH_4^+ /Ethylen).^[116] Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, können zusätzlich die komplexierenden Eigenschaften Histidins von Bedeutung sein. Im Vergleich der häufigsten 1000 Sequenzen zeigt sich auf Corona-behandeltem PP eine stärkere Anreicherung basischer Aminosäuren. Dies ist durch die höhere Präsenz von ionisierbaren sauerstoffhaltigen Gruppen erklärbar, an welche basische Peptide mit positiver Ladung über elektrostatische Wechselwirkung binden können.

Weiterhin sind die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Phenylalanin für die 100 häufigsten Sequenzen der unbehandelten PP-Folie angereichert, während die übrigen hydrophoben Aminosäuren unterdrückt werden. Hierbei sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den genannten Aminosäuren und der unbehandelten PP-Oberfläche denkbar. Bezüglich des weniger hydrophoben Corona-behandelten PP ist keine Anreicherung dieser Aminosäuren erkennbar. Für die isotaktische PP-Folie werden Tryptophan- und Leucin-haltige Peptide angereichert. Alanin zeigte sich hierbei vermehrt unter den häufigsten und einzig für diese Oberfläche selektierten Peptiden. Wird jedoch eine größere Anzahl an Peptidsequenzen betrachtet, ist eine Unterdrückung Alanins zu beobachten, welche für alle untersuchten Oberflächen auftritt. Im Übrigen werden die polaren Aminosäuren Serin, Threonin und Glutamin sowohl für die unbehandelte als auch für die Corona-Oberfläche unterdrückt. Für das isotaktische PP ist dieser Effekt bezüglich Glutamin ebenfalls zu beobachten.

Im Datensatz PP_{iso} befinden sich neben einer allgemeinen Anreicherung von Tryptophan unter den häufigsten 25 Sequenzen einige mehrfach Tryptophan-haltige Peptide, wie SWWWPIDDYTPL und SPSEWPHWTPRL mit Kopienzahlen von 2218 bzw. 2253. Ein weiteres Peptid mit drei Tryptophanresten (HNDNNTDQTWW) wurde mit einer Kopienzahl von 5125 im Sequenzpool des isotaktischen PP gefunden, jedoch durch die Hintergrundkorrektur entfernt. Diese Sequenz tritt ebenfalls in den anderen Phagenbibliotheken auf, jedoch mit deutlich geringeren Kopienzahlen (39x für PP_{cor} ; 55x für PP_{unb} nach der zweiten Runde) und wurde während des Biopannings für die unbehandelte PP-Folie im Vergleich zur ersten Runde nicht angereichert. Einige Tryptophan-haltige Peptide mit den Motiven WXXW^[80],

WXXWXXXW^[117], FHXXW^[118] sowie die Sequenz VHWDFRQWWQPS^[119] sind in der Literatur bereits als „Plastikbinder“ bekannt. Diese Sequenzen wurden in Phagendisplay-Experimenten meist ungewollt selektiert, weil sie eine Affinität für andere Komponenten als das untersuchte Target aufweisen. Die genannten Sequenzen binden nachweislich Polystyrol, aus welchem die für das Biopanning und für Affinitätsassays verwendeten Gefäße bestehen. Es wird vermutet, dass insbesondere π - π -Wechselwirkungen des Tryptophans für die Affinität zu Polystyrol verantwortlich sind. Weitere Aminosäuren, die typischerweise zusammen mit den genannten Motiven auftreten, sind Valin, Phenylalanin, Histidin und Prolin^[119], welche über ihre Seitenketten in der Lage sind starke hydrophobe Wechselwirkungen mit Polystyrol auszubilden. Da in den Phagendisplay-Experimenten im Rahmen dieser Arbeit keine Gefäße aus Polystyrol verwendet wurden und die verwendeten Falcon-Tubes vielmehr ebenfalls aus Polypropylen bestehen, ist eine Target-unspezifische Bindung an Polystyrol auszuschließen. Die hydrophoben Wechselwirkungen, welche von Tryptophan-haltigen Peptiden ausgebildet werden, können jedoch ebenso eine Affinität für PP verursachen. Das Adsorptionsverhalten

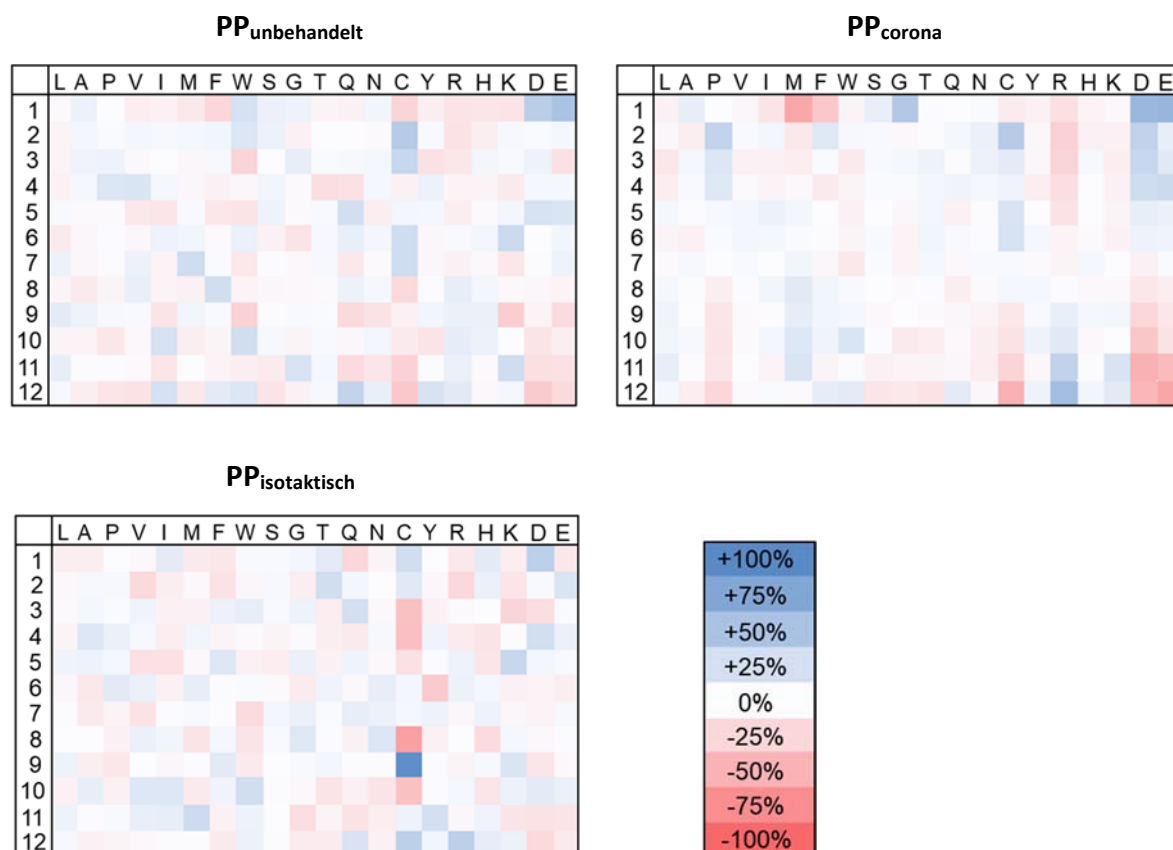


Abbildung 28. Untersuchung von Positionseffekten der 12-mer Peptide in den Illumina-Sequenzpools der PP-Folien. Positionsabhängige Aminosäurezusammensetzung im Vergleich zur amplifizierten Referenzphagenbibliothek für alle Peptide nach der zweiten Panning-Runde mit einer Kopienzahl ≥ 10 und Hintergrundkorrektur (Sequenzen mit einer Kopienzahl über 100 in der Referenzphagenbibliothek eliminiert).

einiger Tryptophan-haltiger Peptide auf der PP-Folie wurde näher untersucht und wird in Kapitel 3.7 besprochen.

Ein weiterer Vorteil der Next-Generation-Sequenzierung ist die Möglichkeit die umfangreichen Sequenzpools auf Positionseffekte untersuchen zu können. Im Folgenden wurde daher die Aminosäurehäufigkeit abhängig von der Position im 12-mer Peptid näher betrachtet (Abbildung 28), wobei die einfach-amplifizierte Phagenbibliothek (Kapitel 3.5.2, Abbildung 26) als Referenz dient. Die Aminosäure Cystein tritt bei PP_{cor} und PP_{unb} gehäuft in den Positionen 2 bis 6 auf und wird N- sowie C-terminal unterdrückt. Der gleiche Effekt wurde bereits in den Referenzdaten beobachtet und wird auch durch Amplifizierungsvorteile verursacht. Die Phagenbibliotheken wurden jedoch nach zwei Biopanning-Runden sequenziert und daher einem zusätzlichen Amplifizierungsschritt ausgesetzt. Dies erklärt den im Vergleich zur einfach amplifizierten Referenzbibliothek verstärkten Cystein-Positionseffekt. Im Gegensatz dazu ist Cystein für das isotaktische PP in Position 9 stark angereichert und in den benachbarten Positionen stark unterdrückt. Eine Anreicherung von Cystein ist auch in der N- und C-terminalen Position zu beobachten. Zusätzlich finden sich vermehrt Peptidsequenzen mit einzelnen Cysteinresten. Werden die häufigsten fünf Cystein-haltigen Peptide jedes Datensatzes betrachtet, zeigen sich für PP_{cor} und PP_{unb} ausschließlich Peptide mit jeweils zwei Cysteinen, während im Datensatz PP_{iso} drei Peptidsequenzen mit einzelnen Cysteinen auftreten (Tabelle 15). Diese Sequenzen konnten sich mit Kopienzahlen von über 1000 anreichern, obwohl während der Amplifizierung eine starke Selektion gegen ungepaarte Cysteine stattfindet. Darüber hinaus haben zwei dieser Sequenzen N-terminal das Tripeptid CWA gemeinsam. Beide Peptidsequenzen sind trotz der hohen Kopienzahlen nicht in den Referenzbibliotheken zu finden und wurden demnach ausschließlich während des Biopannings angereichert. Die Thiolgruppe Cysteins besitzt einen pK_s -Wert nahe dem beim Biopanning vorherrschenden pH 7,5^[120], wodurch Cystein abhängig von der lokalen Umgebung im Peptid auch deprotoniert vorliegen kann. In Proteinen ist Cystein darüber hinaus in seiner freien Form in die Bindung verschiedener Metallionen involviert.^[121] Da die isotaktische PP-Folie geringe Mengen Aluminium und Calcium an der Oberfläche aufweist, ist eine Bindung der Peptide über die Thiolgruppe Cysteins denkbar. In der N-terminalen Position liegt darüber hinaus eine höhere Flexibilität und geringere sterische Abschirmung vor.

Für PP_{unb} und PP_{cor} befinden sich die sauren Aminosäuren vor allem N-terminal und werden am C-terminalen Ende unterdrückt, wohingegen für Arginin und in etwas schwächerer Form auch für Histidin und Lysin der gegenteilige Effekt zu erkennen ist (Abbildung 28). Für das Corona-behandelte PP tritt diese Tendenz in stärkerem Maße auf, während ein derartiger Effekt für PP_{iso} nur sehr schwach zu erkennen ist. Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, werden

ähnliche Tendenzen durch die Amplifizierung verursacht. Diese sind jedoch nicht in gleichem Maße für alle drei Datensätze sichtbar. Die Ursache der stärkeren positionsabhängigen Anreicherungen für PP_{cor} kann daher eventuell durch Sekundärstrukturen der Peptide und damit einhergehende sterische Abschirmungseffekte erklärt werden. Weiterhin weist die Phagenbibliothek des Corona-behandelten PP vermehrt Glycin in N-terminaler Position auf, während Methionin und Phenylalanin in dieser Position unterdrückt werden. Daneben findet sich Prolin verstärkt in der N-terminalen Hälfte der Sequenz. Bezüglich der unbehandelten PP-Folie zeigt sich zusätzlich eine Tryptophan-Anreicherung in N- und C-terminaler Position.

Tabelle 15. Untersuchung von (Di)cystein-Motiven in Illumina-Sequenzpools. Dargestellt sind die häufigsten Peptidsequenzen mit Cystein (gelb markiert). Aminosäureklassen (basisch, sauer, hydrophob, polar) farblich unterschieden.







PP _{corona}		PP _{unbehandelt}		PP _{isotaktisch}	
194	ASYC ^Y GTTN ^R CTL	80	VC ^I SC ^T MT ^R VL ^T	1883	CPGSL ^C CALHAHN
186	QCC ^S SGLLDKRPQ	70	DCGAL ^C KS ^V RLV	1772	CWATSSGYTYMR*
154	VVMPGL ^C YN ^C PR	63	SPKS ^C SP ^C SLLS	1348	CWAKQSLTVLWH*
147	SL ^C DL ^C KKGWYK	60	AAGSLGSG ^C LWC*	1028	EIDSRHGG ^C LAC
142	S ^C CCGLMTLINTK	57	S ^C CCGLMTLINTK	979	DGNRLVNP ^M HC

*Sequenzen treten nicht in den Referenzbibliotheken auf.

Nach der Eliminierung der Sequenzen mit Amplifizierungsvorteilen wurde ein MEME-Scan^[91] für die Suche nach gemeinsamen Motiven unter den häufigsten 1000 Peptidsequenzen jedes Datensatzes durchgeführt (Tabelle 16). Für alle Hintergrund-bereinigten Datensätze ergibt der MEME-Algorithmus mit ausreichend hoher Signifikanz lediglich Dicystein-Motive, ähnlich den für die Referenzbibliotheken gefundenen Motiven, mit Abständen von 0 bis 5 Aminosäuren zwischen beiden Cysteinresten. Diese Motive treten jeweils bei 4 - 9 Sequenzen der insgesamt 1000 untersuchten Peptide auf und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Effekt der Unterdrückung einzelner Cysteine bei der Phagenamplifizierung zurückzuführen. Dennoch ist denkbar, dass die Disulfidbindung zweier Cysteine, welche zu einer ringförmigen und damit starrereren Struktur der Peptide führt, für die Bindung der Peptide auf PP vorteilhaft ist. Zusätzlich wurden für das Corona-behandelte PP Dicystein-Motive gefunden, welche in der Nachbarschaft des Cysteins hydrophobe und basische Aminosäuren (Leucin, Arginin, Lysin) aufweisen.

Basierend auf den beobachteten Positionseffekten und Motiven wurden für die Synthese und Charakterisierung unter anderem Cystein- und Tryptophan-haltige Peptidsequenzen sowie Peptide mit N- oder C-terminalem Glycin, Arginin oder Asparagin ausgewählt und bezüglich ihrer Affinität zu PP untersucht (Kapitel 3.7).

Tabelle 16. Ergebnisse der MEME-Suche nach gemeinsamen Motiven unter den häufigsten 1000 Sequenzen der PP-Datensätze nach Hintergrundkorrektur. Bedingungen des MEME-Scans: Motivbreite: 2-12; Mindestzahl Sequenzen mit Motiv: 2.^[91]

		Motiv	Anzahl	Breite
PP _{unbehandelt}	1.		5	2
	2.		7	5
PP _{corona}	1.		4	6
	2.		6	8
PP _{isotaktisch}	1.		9	6
	2.		7	4

3.5.3.2 Normierung der Kopienzahlen zur Eliminierung der Amplifizierungstendenzen

Neben der Hintergrundkorrektur wurde ein weiterer Ansatz zur Eliminierung der schnell-amplifizierenden Sequenzen für die Phagenbibliothek PP_{unb} nach der ersten Panning-Runde getestet. In diesem Ansatz wurde die Häufigkeit der Sequenzen anhand ihrer Kopienzahlen in der amplifizierten Referenzbibliothek normiert (Kapitel 6.4.3). Werden die Sequenzen nach dieser normierten Anzahl geordnet, stehen solche Sequenzen an der Spitze, die gehäuft in den Target-Datensätzen auftreten, aber weder bereits in der Ursprungsbibliothek angereichert waren noch vermehrt amplifiziert wurden (Tabelle 17). Im Vergleich zum Ansatz der Hintergrundkorrektur werden hierbei Sequenzen mit Amplifizierungsvorteilen eliminiert ohne das Sequenzen verlorengehen, welche sowohl stark angereichert sind als auch eine hohe Affinität für das Target aufweisen. Beispielsweise erhält die Sequenz DYHDSLPTLRK, welche in den Target-Bibliotheken mit den höchsten Kopienzahlen auftritt, eine normierte Häufigkeit von 7,4 während andere Sequenzen Häufigkeiten von über 100 aufweisen. Eine Normierung der Sequenzhäufigkeit nach zwei Panning-Runden wurde nicht durchgeführt, weil die Referenzphagenbibliothek hierfür ebenfalls ein zweites Mal amplifiziert und sequenziert werden müsste.

Tabelle 17. Dargestellt sind die gefundenen Kopienzahlen sowie die berechneten normierten Häufigkeiten einiger Beispielsequenzen zum besseren Verständnis der durchgeführten Normierung.

Sequenz	Häufigkeit in initialer Referenzbibliothek (8,7 Mio. Seq.)	Häufigkeit in amplifizierter Referenzbibliothek (9,9 Mio Seq.)	Häufigkeit in PP _{unbehandelt} Panning-Runde 1 (2,8 Mio. Seq.)	Normierte Häufigkeit
QVNLGERSQQM	20.096	25.526	12.797	1,8
RDYHPRDHTATW	8542	11.905	7362	2,2
DYHDPSLPTLRK	2511	7173	15.107	7,4
HVSTTDLLGPRR	71	86	1900	77,3
NFLGAVAKGAIH	58	62	1632	92,1
SCTLERCMYRNG	3	1	40	140,0

Eine Liste der Peptide mit den höchsten normierten Häufigkeiten zeigt zum größten Teil bisher unbekannte Sequenzen, welche inmitten der enorm großen Datenmenge zunächst nicht auffällig waren (Abbildung 29). Bezüglich der Aminosäurezusammensetzung weisen die normierten Sequenzen, vor allem solche mit hohen normierten Kopienzahlen, einen höheren Anteil basischer Aminosäuren sowie Tyrosin auf. Saure Aminosäuren sowie Glutamin und Asparagin werden dagegen unterdrückt. Die Sequenz SCTLERCMYRNG, welche mit 140 die höchste normierte Kopienzahl erhält, besitzt darüber hinaus zwei Cysteinreste. Eine Anreicherung von Cystein bezogen auf die gesamten Sequenzen kann hingegen nicht festgestellt werden.

Verglichen mit dem Sequenzsatz, welcher nach der Hintergrundkorrektur erhalten wurde, sind einige Unterschiede festzustellen. Beispielsweise war die Anreicherung von Tyrosin nach der Hintergrundkorrektur nicht zu beobachten. Denkbar sind π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Seitengruppe Tyrosins mit aromatischen π -Systemen an der Oberfläche der PP-Folie. Diese könnten beispielsweise von phenolbasierten Additiven herrühren, die in der Polyolefin-Produktion üblich sind.^[122] Hierbei ist anzumerken, dass sp^2 -hybridisierter Kohlenstoff auf der PP-Folie nachgewiesen wurden, welcher in Form aromatischer oder auch linearer π -Systeme vorliegen könnte (Kapitel 3.1).

Weiterhin sind die Anteile der hydrophoben Aminosäuren im normierten Datensatz kaum verändert. Eine Anreicherung basischer Aminosäuren ist, wie in der Hintergrund-bereinigten Bibliothek ersichtlich, wobei diese für Lysin geringer ausfällt als für die übrigen basischen Aminosäuren. Die Bindung der Peptide auf der unbehandelten PP-Oberfläche scheint maßgeblich durch basische Aminosäuren beeinflusst zu werden. Vermutlich sind dabei Ladungseffekte zwischen den protonierten Aminen und einer negativ geladenen Oberfläche entscheidend. Hydrophobe Wechselwirkungen scheinen dagegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

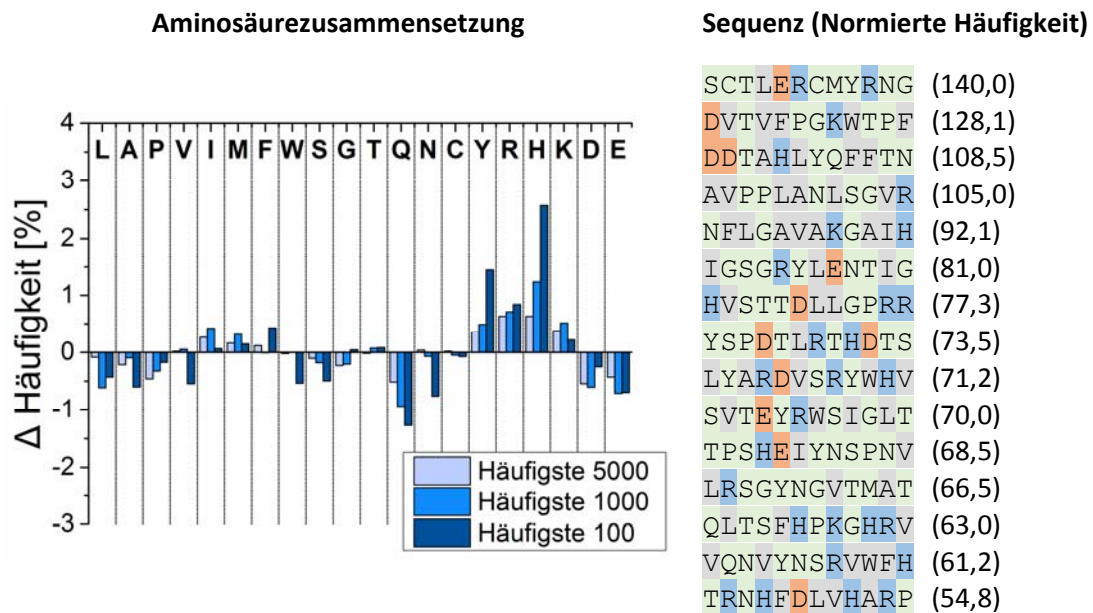


Abbildung 29. Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung der 12-mer Peptide im normierten Illumina-Sequenzpool. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren im Vergleich zur einfach amplifizierten Referenzbibliothek (links) und Sequenzen mit der höchsten normierten Häufigkeit (rechts). Aminosäureklassen farblich markiert (basisch, sauer, hydrophob, polar).

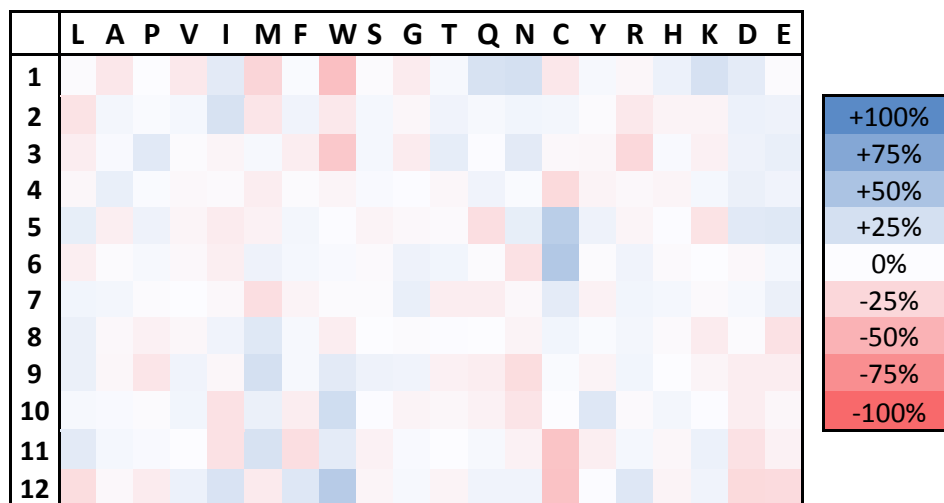


Abbildung 30. Untersuchung von Positionseffekten der 12-mer Peptide im normierten Illumina-Sequenzpool. Dargestellt ist die positionsabhängige Aminosäurezusammensetzung im Vergleich zur amplifizierten Referenzphagenbibliothek für die ersten 5000 Peptide der normierten Phagenbibliothek nach einer Biopanning-Runde auf unbehandeltem PP.

Die positionsabhängige Anreicherung einzelner Aminosäuren der normierten Bibliothek PP_{unb} im Vergleich zur Referenzbibliothek ist in Abbildung 30 dargestellt. Ähnlich den durch die Hintergrundkorrektur erhaltenen Daten, ist eine Anreicherung von Tryptophan in Position 9 - 12 und ein vermehrtes Auftreten Cysteins in der Mitte der Sequenz zu beobachten. Zusätzlich treten die basischen Aminosäuren Lysin und Histidin gehäuft in N-terminaler Position auf. Die

sauen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure befinden sich gehäuft in der N-terminalen Peptidhälfte und werden C-terminal leicht unterdrückt. Die stark hydrophobe Aminosäure Isoleucin ist in Position 1 und 2 sowie C-terminal angereichert. Bezüglich der ebenfalls hydrophoben Aminosäurereste Alanins und Valins ist dagegen eine leichte Unterdrückung an der N-terminalen Position zu beobachten.

3.5.4 Vergleich der Sequenzpools verschiedener PP-Folien

Im Folgenden sollen die Illumina-Daten der sequenzierten Phagenbibliotheken für die verschiedenen PP-Folien verglichen werden. Nach der zweiten Biopanning-Runde weisen alle sequenzierten Bibliotheken eine geringe Diversität auf, wobei wenige stark angereicherte Sequenzen einen Großteil der Bibliothek darstellen. Für die unbehandelte PP-Folie entsprechen die häufigsten 20 Sequenzen 82% der gesamten Bibliothek. Dagegen sind diese für die Corona-behandelte PP-Folie mit einem Anteil von 44% weniger stark angereichert. Die Bibliothek PP_{cor} weist insgesamt die meisten verschiedenen Sequenzen auf und enthält einen deutlich größeren Anteil an Sequenzen mit Kopienzahlen zwischen 10 und 1000. Durch die erhöhte Polarität und die höhere Oberflächenenergie der Corona-behandelten Folie ist diese etwas höhere Diversität der Phagenbibliothek im Vergleich zu PP_{unb} erklärbar. Die geringste Diversität ist für die Bibliothek PP_{iso} festzustellen, in welcher auf 1,7 Mio. Sequenzen nur 8660 verschiedene Peptide entfallen. Die isotaktische PP-Folie unterscheidet sich von PP_{cor} und PP_{unb} durch eine geringere Probengröße (PP_{unb/cor} 4,0 cm²; PP_{iso} 0,25 cm²) und einen eher heterogenen Charakter. Beide Faktoren sind durch die Herstellungsart bedingt und beeinflussen das Biopanning in entscheidendem Maße. Weiterhin sind die häufigsten drei Sequenzen für alle Datensätze identisch und die Sequenz DYHDP_{SLPTLRK} zeigt mit Kopienzahlen zwischen 0,5 und 1,6 Millionen jeweils die größte Anreicherung. Für PP_{unb} und PP_{cor} sind die häufigsten fünf Sequenzen identisch und auch unter den übrigen stark angereicherten Sequenzen finden sich viele Übereinstimmungen.

Bezüglich der Aminosäurezusammensetzung sind ähnliche Tendenzen für PP_{unb} und PP_{cor} sichtbar. Dies sind zum einen die allgemeine Anreicherung basischer Aminosäuren und zum anderen die Unterdrückung saurer Aminosäuren. Darüber hinaus werden die meisten hydrophoben Aminosäuren sowie Threonin und Glutamin für beide Targets unterdrückt. Für die isotaktische PP-Folie, welche über eine grundverschiedene Herstellungsmethode mit anderem Ausgangsmaterial erzeugt wurde, sind diese Trends nicht zu beobachten. Werden positionsabhängige Anreicherungen der Aminosäuren betrachtet, zeigt sich ebenfalls eine

größere Ähnlichkeit zwischen PP_{cor} und PP_{unb} im Vergleich zur isotaktischen PP-Folie. Bei beiden Targets werden positionsabhängige Anreicherungen der basischen und sauren Aminosäuren sowie für Cystein beobachtet, welche für PP_{iso} nicht auftreten. Hierbei wird deutlich, dass die aus einem Phagendisplay-Experiment resultierenden Sequenzpools umso mehr voneinander abweichen, je stärker sich die Oberflächen des Targets unterscheiden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Affinität der selektierten Peptide für die jeweilige Oberfläche größtenteils auf dem geringen Vorkommen anderer Elemente als Kohlenstoff beruht. Für PP_{iso} wurden Spuren von Aluminium und Calcium nachgewiesen, welche zum Beispiel die Bindung Histidin-haltiger Peptide ermöglichen können. Für PP_{cor} und PP_{unb} weisen die Sequenzdaten darauf hin, dass die Affinität der Peptide zum größten Teil auf Ladungswechselwirkungen der Aminogruppen basischer Peptide, möglicherweise mit negativ geladenen sauerstoffhaltigen Gruppen an der Oberfläche, beruhen. Dagegen scheinen hydrophobe Wechselwirkungen auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse der Sequenzanalyse und entgegen der ursprünglichen Erwartungen für keines der PP-Targets einen entscheidenden Beitrag zur Bindung der Peptide darzustellen.

Im nächsten Schritt wurde die Überschneidung der Sequenzpools sowie die einzigartigen Sequenzen für PP_{cor} und PP_{unb} genauer untersucht. Insgesamt werden nur 7631 Peptidsequenzen (0,5% für PP_{cor}; 10,2% für PP_{unb}) gleichzeitig in beiden Bibliotheken gefunden. In diesem gemeinsamen Sequenzpool befinden sich jedoch die meisten der stark angereicherten Sequenzen. Dagegen tritt der größte Teil der Sequenzen, welche nur in einer Bibliothek vorkommen, in sehr niedrigen Kopienzahlen unter 10 auf. Folglich ist die Übereinstimmung beider Bibliotheken sehr groß, sofern die Gesamtzahl aller Sequenzen betrachtet wird (76% für PP_{cor}; 99% für PP_{unb}). Unter den häufigsten 100 Sequenzen befindet sich in jedem der Datensätze jeweils nur eine einzige Sequenz, welche nicht im anderen Datensatz vorkommt.

Im Folgenden sollen solche Sequenzen näher betrachtet werden, welche ausschließlich für eine der PP-Oberflächen selektiert wurden. In Tabelle 18 sind die häufigsten 10 einzigartigen Peptidsequenzen für beide Sequenzpools dargestellt. Die Sequenzen mit den höchsten Kopienzahlen für PP_{unb} weisen, insbesondere bei basischen Aminosäuren, viele geladene Seitengruppen auf. Für beide Targets liegen die Nettoladungen der häufigsten Peptide bei pH 7 im positiven Bereich. Vor allem für PP_{cor} treten einige mehrfach positiv geladene Peptide unter den häufigsten 10 Sequenzen auf. Dagegen enthält nur eine Peptidsequenz eine saure Aminosäure.

Tabelle 18. Vergleich der Sequenzpools für PP_{unb} und PP_{cor}. Dargestellt sind die häufigsten Sequenzen, welche jeweils ausschließlich in einem der beiden Datensätze vorkommen. Aminosäureklassen (basisch, sauer, hydrophob, polar) farblich unterschieden. Datensätze werden nach Hintergrundkorrektur betrachtet (Sequenzen mit einer Kopienzahl über 100 in der Referenzphagenbibliothek eliminiert).

Platz	PP _{unbehandelt}	Kopienzahl	Platz	PP _{corona}	Kopienzahl
25	SSEANS ^h HRWLRH ^h	2706	84	NSVASLRVLGYM ^h	854
111	THIRPTEIRHTF ^h	712	110	TPGPVSPK ^h TIRS ^h	644
187	TNLKE ^h PYKPSGH ^h	436	152	AVGVRNGSFMLP ^h	499
205	HGSYFTTHMTAA ^h	395	204	SWMP ^h SLQFGPFP ^h	381
275	NPSANSVTVRYT ^h	299	285	VGGSPSSWSGVL ^h	261
299	KNIPPDLPIHAG ^h	278	288	HWHTVGPIKSGR ^h	258
315	SAQIPK ^h PLPFIK ^h	262	298	FMPQLPVKALYR ^h	249
342	YFARAGGASGMK ^h	229	323	HGNSGIPPLGRT ^h	226
347	AQGHNGVLVSVW ^h	224	326	EVSKLPYKLRLT ^h	223
348	HQSTMYGSLGIK ^h	223	344	SPLNTSSGVLRG ^h	210

In Abbildung 31 werden die häufigsten 1000 einzigartigen Sequenzen bezüglich der Aminosäurezusammensetzung dargestellt. Es zeigen sich ähnliche Trends beider Datensätze in Bezug auf die basischen und sauren Aminosäuren, welche mit den Beobachtungen der gesamten Bibliotheken übereinstimmen. Auffällig ist hingegen, dass die Anreicherung der basischen Aminosäuren für Peptide, welche ausschließlich in der Bibliothek PP_{cor} vorkommen, deutlich stärker ausfällt. Weiterhin werden die aliphatischen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin für PP_{cor} unterdrückt, während für PP_{unb} keine Änderung erkennbar ist oder im Fall von Leucin sogar eine Anreicherung stattfindet. Diese Ergebnisse zeigen, dass basische

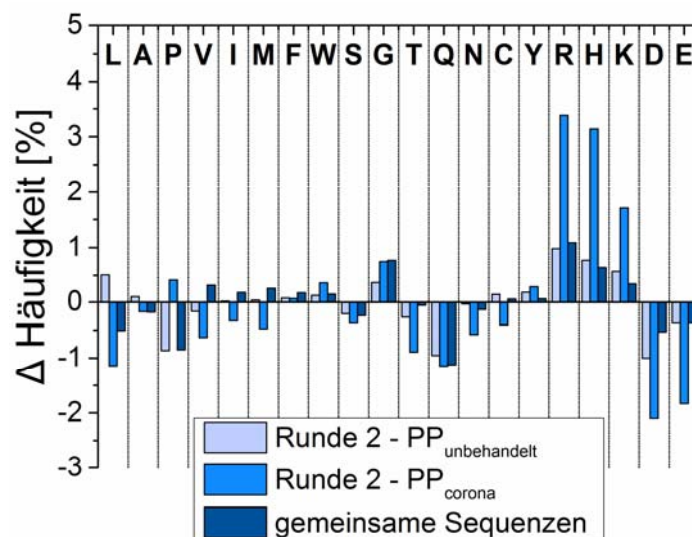


Abbildung 31. Vergleichende Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung der Sequenzpools PP_{unb} und PP_{cor}. Dargestellt ist die Differenz der prozentualen Häufigkeit einzelner Aminosäuren nach der zweiten Biopanning-Runde im Vergleich zur initialen Bibliothek, wobei die häufigsten 1000 gemeinsamen und einzigartigen Sequenzen für die unbehandelte und Corona-behandelte PP-Folie verglichen werden.

Aminosäuren mit großer Wahrscheinlichkeit für die Affinität der Peptide zu beiden PP-Oberflächen verantwortlich sind, jedoch in stärkerem Maße für das Corona-behandelte PP. Wie im Kapitel 3.1 beschrieben, zeigten XPS-Messungen die Präsenz von Sauerstoff in Form von C-O sowie C=O-Spezies auf beiden Seiten der Folie und dabei in einem höheren Anteil auf der Corona-Seite. Wechselwirkungen der Arginin- und Histidin-haltigen Peptide mit diesen funktionellen Gruppen sind auf der Corona-behandelten PP-Folie daher vermehrt möglich, wodurch die stärkere Anreicherung dieser Aminosäuren erklärt werden kann. Für die unbehandelte Folie können zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen zur Bindung beitragen, wie die leichte Anreicherung von Leucin zeigt.

3.5.5 Eigenschaftsanalyse der Peptidsequenzen

Im nächsten Schritt wurden Berechnungen verschiedener Eigenschaften, wie der Nettoladung oder Hydrophobie, der häufigsten 1000 Peptide in den PP_{unb}-Datensätzen durchgeführt. Auf diese Weise ist es möglich, Tendenzen hin zu bestimmten Eigenschaften zu erkennen und deren Bedeutung für die Affinität der Peptide zu PP abzuschätzen. Die Berechnungen wurden auf den Sequenzpool der unbehandelten PP-Folie beschränkt, da diese Oberfläche gegenüber der Corona-behandelten Folie für die Entwicklung wasserbasierter Binder die höchste Relevanz besitzt. Die ausgewählten Eigenschaften wurden demnach für alle Sequenzen der Datensätze für PP_{unb} sowie der Referenzbibliotheken berechnet und im Durchschnitt für die häufigsten Sequenzen dargestellt (Tabelle 19). Eine parallele Untersuchung des Sanger-Sequenzpools in Hinblick auf die ausgewählten Eigenschaften ist nicht sinnvoll, da die statistischen Durchschnittswerte aufgrund der geringen Sequenzanzahl nicht mit ausreichender Signifikanz berechnet werden können. Hierfür ist ein umfangreicher Sequenzdatensatz nötig, welcher nur durch Hochdurchsatz-Sequenzierung erreichbar ist, womit ein weiterer Vorteil der Illumina-Methode deutlich wird.

Der aliphatische Index eines Proteins nach Ikai ist definiert als das relative Volumen, welches von den aliphatischen Seitengruppen der Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin eingenommen wird.^[123] Je größer das Volumen der aliphatischen Gruppen ist, desto größer ist der Wert. Für die häufigsten 100 bzw. 1000 Sequenzen der Referenzbibliotheken beträgt der aliphatische Index durchschnittlich ca. 70, während für PP_{unb} etwas niedrigere Werte erhalten werden. Wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, ist lediglich eine geringe Anreicherung Isoleucins zu beobachten, wohingegen Alanin, Leucin und Valin im Vergleich zur Referenz unterdrückt werden. Werden dagegen ausschließlich die 20 Sequenzen mit den höchsten normierten

Häufigkeiten betrachtet, bleibt der aliphatische Index unverändert bei ca. 70. Unter den fünf häufigsten Sequenzen befinden sich die Peptide AVPPLANLSGVR und NFLGAVAKGAIH mit sehr hohen aliphatischen Indizes von 130 bzw. 114. Neben einer allgemeinen Unterdrückung dieser Aminosäuren können sich also einzelne Sequenzen mit voluminösen aliphatischen Resten stark anreichern. Unerwartet legen die Daten somit nahe, dass das Volumen der aliphatischen Seitenketten nicht die Eigenschaft darstellt, nach welcher auf der PP-Folie primär selektiert wurde. Der Einfluss der aliphatischen Aminosäuren auf die Adsorption der Peptide auf PP wird im Kapitel 3.7 näher untersucht.

Tabelle 19. Eigenschaften der häufigsten Sequenzen verschiedener Phagenbibliotheken (Markierung entsprechend der Höhe der Werte). Der aliphatische Index (Ikai) gibt das relative Volumen der aliphatischen Seitengruppen an.^[123] Die Berechnung der Nettoladung basiert auf der Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben von Moore und wurde für pH 7 berechnet.^[124] Der GRAVY Index entspricht der Summe der Hydropathie-Indizes der einzelnen Aminosäuren geteilt durch die Anzahl der Reste.^[125] Der Boman-Index entspricht der Summe der freien Energien der jeweiligen Seitenketten für den Transfer von Cyclohexan in Wasser basierend auf Radzeka und Wolfenden^[126], dividiert durch die Gesamtzahl der Reste.^[127]

	Sequenzen	Aliphatischer Index	Nettoladung (pH 7)	GRAVY Hydrophobie	Boman-Index
Referenzbibliothek	Häufigste 100	70,0	-0,05	-0,29	1,37
	Häufigste 1000	69,5	-0,08	-0,34	1,57
Referenz amplifiziert	Häufigste 100	70,9	-0,12	-0,28	1,31
	Häufigste 1000	70,1	-0,06	-0,33	1,54
PP_{unbehandelt} Runde 1	Häufigste 100	67,2	+0,09	-0,39	1,50
	Häufigste 1000	68,7	+0,04	-0,39	1,65
PP_{unbehandelt} Runde 2	Häufigste 100	67,7	+0,62	-0,49	1,81
	Häufigste 1000	66,3	+0,38	-0,45	1,76
PP_{unbehandelt} Runde 1 (normiert)	Häufigste 20	70,6	+0,42	-0,52	2,02
	Häufigste 100	63,3	+0,34	-0,53	1,82
	Häufigste 1000	66,2	+0,39	-0,47	1,75

Weiterhin wurde die durchschnittliche Nettoladung der Peptide bei neutralem pH-Wert betrachtet.^[124] Für die Referenzbibliotheken werden negative Nettoladungen erhalten, wohingegen für PP_{unb} ein deutlicher Trend zu positiven Nettoladungen zu beobachten ist. Die höchsten Nettoladungen wurden für die häufigsten 100 Peptide nach der zweiten Runde sowie die 20 Peptide mit der größten normierten Häufigkeit berechnet. Die positive Nettoladung dieser Peptidsequenzen wird durch die Anreicherung basischer und die Unterdrückung saurer Aminosäuren verursacht. Coulombwechselwirkungen scheinen ein essentieller Faktor für die Affinität der Peptide zur PP-Oberfläche zu sein.

Die Hydrophobie wurde anhand des GRAVY-Index berechnet (engl. Grand Average of Hydropathy), wobei die Hydrophobie der Peptidsequenz abnimmt je kleiner der GRAVY-Index ist.^[125] Hierbei werden neben den aliphatischen Aminosäuren auch besonders hydrophobe aromatische Aminosäuren wie Tryptophan oder Phenylalanin betrachtet. Die häufigsten Peptide der Referenzbibliotheken erhalten GRAVY-Werte um -0,3. Dagegen werden niedrigere Werte von -0,4 bis -0,5 für die häufigsten Sequenzen der Bibliotheken PP_{unb} berechnet, das heißt die Hydrophobie dieser Peptide ist im Durchschnitt geringer als in der Referenzbibliothek. Insbesondere die Sequenzen mit der höchsten normierten Häufigkeit stechen durch besonders niedrige GRAVY-Werte hervor. Anzumerken ist hierbei auch die Problematik der Verwendung von Tween-20 während des Phagendisplay-Pannings. Einerseits ist ein Tensid zur Vermeidung der Selektion unspezifisch bindender Phagen nötig, andererseits werden aber durch Tween-20 schwache hydrophobe Wechselwirkungen unterdrückt. Somit wurden möglicherweise vermehrt Peptidsequenzen selektiert, dessen Bindungsmechanismus mit der Oberfläche nicht primär auf schwachen hydrophoben Interaktionen basiert.

Der von Boman vorgeschlagene potentielle Proteininteraktionsindex ist gleich der Summe der Löslichkeitswerte für alle Aminosäuren in einer Peptidsequenz und soll eine Gesamtschätzung des Bindungspotentials ermöglichen.^[127] Zur Normierung wird der Wert durch die Anzahl der Aminosäuren geteilt. Hierbei ist anzumerken, dass dieser Index ursprünglich für antimikrobielle Peptide entwickelt wurde, um deren Bindungspotential an bakteriellen Proteinen oder Membranen abzuschätzen. Es kann jedoch sinnvoll sein, diesen Index auch für das PP-Peptid-System anzuwenden, da die Bindung der Peptide aus wässrigen Lösungen geschehen soll und Löslichkeitswerte dabei von entscheidender Bedeutung sind. Für die Peptide der Bibliothek PP_{unb} nach der zweiten Panning-Runde sowie für den normierten Datensatz werden deutlich höhere Boman-Indizes verglichen mit den Referenzsequenzen berechnet. Die häufigsten 20 Sequenzen der normierten Bibliothek erhalten im Durchschnitt mit 2,02 den höchsten Wert, wobei die Sequenz mit der höchsten normierten Häufigkeit SCTLERCMYRNG einen Boman-Index von 3,2 besitzt.

Zusätzlich wurden die sogenannten FASGAI Werte^[128] (engl. Factor Analysis Scale of Generalized Amino Acid Information) für die häufigsten Sequenzen verschiedener Datensätze berechnet (Tabelle 20). Dies ist ein Satz von Aminosäuredeskriptoren, die unter anderem die Sekundärstruktur, das Volumen sowie elektronische Eigenschaften widerspiegeln. Jeder Wert wird dabei aus insgesamt 335 mehrdimensionalen Eigenschaften für die jeweiligen Aminosäuren zusammengesetzt.

Tabelle 20. Spezielle Eigenschaften der häufigsten Sequenzen verschiedener Phagenbibliotheken des PP_{unb}-Screenings basierend auf FASGAI-Werten (Markierung entsprechend der Höhe der Werte).^[128]

	Untersuchte Sequenzen	α -Helix und β -Faltblatt-Neigung	Volumen-Eigenschaften	Elektronische Eigenschaften
Referenz-bibliothek	Häufigste 100	-0,21	-0,24	-0,10
	Häufigste 1000	-0,16	-0,20	-0,07
Referenz (amplifiziert)	Häufigste 100	-0,22	-0,20	-0,12
	Häufigste 1000	-0,16	-0,19	-0,07
PP_{unbehandelt} Runde 1	Häufigste 100	-0,20	-0,19	-0,07
	Häufigste 1000	-0,17	-0,18	-0,05
PP_{unbehandelt} Runde 2	Häufigste 100	-0,16	-0,19	0,01
	Häufigste 1000	-0,18	-0,17	-0,01
PP_{unbehandelt} Runde 1 (normiert)	Häufigste 20	-0,17	-0,10	0,07
	Häufigste 100	-0,19	-0,14	-0,01
	Häufigste 1000	-0,18	-0,15	0,00

Der erste Faktor in Tabelle 20 gibt die Neigung einer Peptidsequenz an, eine α -Helix oder ein β -Faltblatt auszubilden. Positive Werte korrelieren dabei mit einer Tendenz zu einer α -Helix und hohe negative Werte entsprechen einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein β -Faltblatt. Für die meisten Peptide werden Werte zwischen +0,7 und -1,1 berechnet. Die durchschnittlichen Berechnungen zeigen, dass kein klarer Trend zu einer bestimmten Sekundärstruktur vorhanden ist. Der Großteil der Sequenzen erhält leicht negative Werte und neigt damit weder zu einer α -Helix noch zu einem β -Faltblatt. Auch bei näherer Betrachtung der einzelnen Sequenzen wird keine Tendenz zu einer bestimmten Sekundärstruktur deutlich. Der zweite Wert betrifft das Volumen der Peptidsequenz, wobei verschiedene Faktoren wie das van-der-Waals-Volumen der einzelnen Aminosäuren und der Streumassenradius einfließen. Je niedriger dieser Wert ist, desto geringer ist das Volumen der Peptidsequenz. Für die Peptide der Phagenbibliotheken PP_{unb} ist im Vergleich zur Referenz eine Tendenz zu größeren Volumen erkennbar. Ein höheres Volumen kann eine geringere konformative Flexibilität bewirken und somit potentiell vorteilhaft für die Bindung sein. Das größte durchschnittliche Volumen weisen die Sequenzen mit der höchsten normierten Häufigkeit auf. Eines der zehn häufigsten Sequenzen dieses Datensatzes, das Peptid LYARDVSRVWHV, erhält mit +0,39 einen besonders hohen Volumenwert. Dieses Peptid ist eines der Sequenzen, welche synthetisiert und hinsichtlich der Adsorption auf PP untersucht wurden (Kapitel 3.7). Der dritte Wert in Tabelle 20 fasst die elektronischen Eigenschaften der Peptidsequenzen zusammen. Dieser Wert beinhaltet neben der Nettoladung und dem isoelektrischen Punkt auch das Potential der Ladungsübertragung. Für PP_{unb} ist bezüglich der elektronischen Eigenschaften ein Trend zu positiven Werten festzustellen. Erneut werden die höchsten Werte

für die häufigsten normierten Sequenzen berechnet, wobei die Sequenz LYARDVSRVYWHV mit +0,44 den höchsten Wert unter den ersten 100 Sequenzen erhält.

Zusammenfassend sind bezüglich der besprochenen Eigenschaften einige Trends der auf PP selektierten Phagenpeptide festzustellen. Im Vergleich zu den Referenzbibliotheken tendieren die Sequenzen zu einer positiven Nettoladung, geringerer Hydrophobie und hohen Boman-Indizes, das heißt einer hohen Löslichkeit in Wasser. Der aliphatische Faktor nimmt im Allgemeinen ab, steigt jedoch für die häufigsten normierten Sequenzen. Weiterhin zeigen die FASGAI-Werte Tendenzen zu großen Volumen und eine Veränderung der elektronischen Eigenschaften. Gemeinsame Merkmale von Sekundärstrukturen, welche auf eine α -Helix oder ein β -Faltblatt hindeuten, konnten dagegen nicht festgestellt werden.

3.5.6 Vergleich der Illumina- und Sanger-Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit ist Phagen-DNA, welche nach mehrmaligem Biopanning auf PP-Folien erhalten wurde, sowohl über die Sanger- als auch über die Illumina-Methode sequenziert worden (Abbildung 32). Insgesamt wurden drei Runden Biopanning durchgeführt, wobei nach jeder Runde Sanger-Sequenzierungen einzelner Klone erfolgten. Hierfür mussten alle Phagenklone separat von Agarplatten gepickt und getrennt amplifiziert werden. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion sowie die Zugabe eines Primers für die Sanger-Sequenzierung. Illumina-Sequenzierungen der vollständigen Phagenbibliotheken wurden nach der ersten sowie zweiten Panning-Runde durchgeführt. Dafür wurde die Phagen-DNA ebenfalls extrahiert, gefolgt von PCR und Gelelektrophorese des PCR-Produktes. Für die unbehandelte PP-Folie konnten auf diese Weise insgesamt 76 Phagenklone über die Sanger-Sequenzierung erhalten werden. Im Gegensatz dazu lieferte die Illumina-Sequenzierung 6,1 Millionen Rohsequenzen, welche nach Übersetzung ins Peptid und Qualitätsfiltern 1,65 Millionen Peptidsequenzen ergaben. Der Arbeitszeitaufwand für die separate Amplifizierung, DNA-Extraktion und Primerzugabe der 76 Phagenklone als Vorbereitung für die Sanger-Sequenzierung ist dabei bereits deutlich größer als die Vorbereitung der vollständigen Phagenbibliothek für Illumina-Sequenzierung einschließlich der PCR. Die Sequenzierung selbst wurde von den Biotech-Firmen *StarSeq* (Mainz) und *GATC* (Konstanz, jetzt *Eurofins*) durchgeführt. Bezüglich der Kosten sind 3-5 Euro pro Phagenklon für die Sanger-Sequenzierung und ca. 450 Euro für die Illumina-Sequenzierung einer Probe anzusetzen. Am Beispiel der Bibliothek PP_{unb} zeigt sich, dass die Sanger-Sequenzierung von lediglich 76 Klonen mit ca. 300 Euro nicht wesentlich günstiger ist, als die Illumina-

Sequenzierung einer vollständigen Bibliothek. Vor allem bei einem Vergleich pro Peptidsequenz, zeigt sich das wesentlich bessere Preis-Leistungs-Verhältnis der Illumina-Sequenzierung (ca. 0,03 Cent pro Sequenz). Ein Nachteil der Illumina-Sequenzierung ist hingegen der deutlich höhere Aufwand für die Auswertung der Rohdaten, wofür die Entwicklung eines Computerprogramms notwendig war.

Typischerweise geschieht die Anreicherung der bindenden Sequenzen über die wiederholten Biopanning-Runden, sofern Sanger-Sequenzierung einzelner Klone durchgeführt wird (Abbildung 32). Gleichzeitig übt die Amplifizierung der Phagen in *E. coli* einen starken Selektionsdruck aus. Aus diesem Grund entfällt zum Beispiel für PP_{unb} der Großteil der sequenzierten Klone nach der dritten Runde auf nur eine Sequenz. Über Illumina-Sequenzierung der vollständigen Phagenbibliothek werden Sequenzen, welche nach drei Runden in der Sanger-Sequenzierung dominieren, bereits nach der ersten Runde sichtbar. Darüber hinaus erlaubt die große Datenmenge eine deutlich bessere Statistik bezüglich der Aminosäurezusammensetzung, einschließlich einer Positionsanalyse, und weiteren Sequenzeigenschaften wie der Hydrophobie. Beispielsweise konnte die deutliche

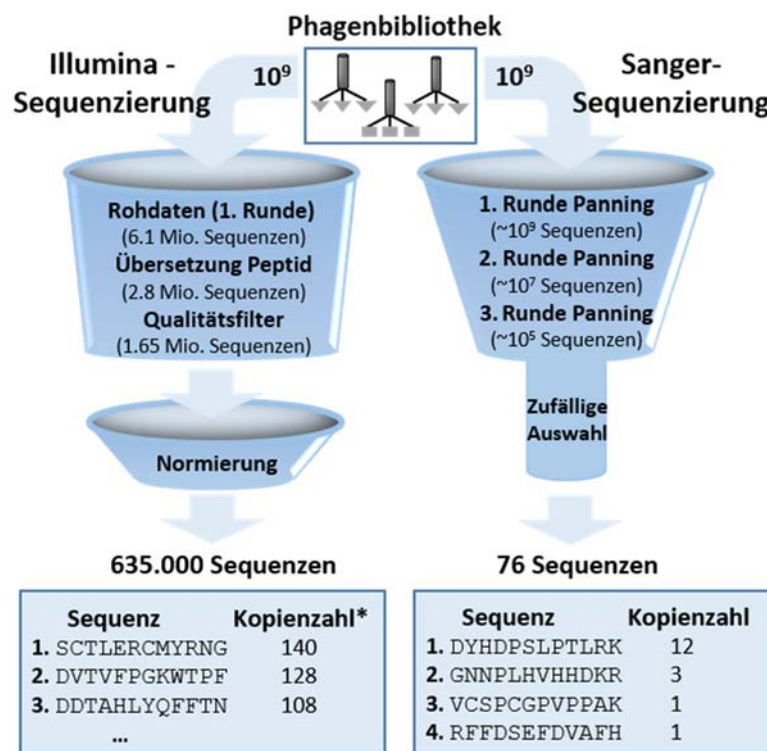


Abbildung 32. Schematische Gegenüberstellung der DNA-Sequenzierungsmethoden nach einem Phagendisplay-Experiment. Dargestellt sind die Sequenzen nach der dritten Panning-Runde (Sanger) sowie die ersten drei Sequenzen im normierten Datensatz (Illumina). Bei Verwendung der Sanger-Methode erfolgt die Selektion potentieller Binder über wiederholte Panning-Runden und die Zahl der möglichen Sequenzen ist stark limitiert. Wird die Illumina-Sequenzierung verwendet ist nur eine Panning-Runde nötig und anschließend erfolgt die Selektion über Normierung des Datensatzes.

*Normierte Häufigkeit.

Anreicherung basischer Aminosäuren bei gleichzeitiger Unterdrückung saurer Aminosäuren im Sanger-Sequenzpool aufgrund der geringen Datenmenge nur teilweise erkannt werden. Die Schwierigkeit bezüglich der Illumina-Daten besteht darin, aus über einer Million verschiedenen Sequenzen die vielversprechendsten Binder auszuwählen. Hierfür wurde die im Kapitel 3.5.3 besprochene Normierung anhand von Referenzbibliotheken durchgeführt, wonach die Kopienzahlen der Sequenzen normiert werden, um eventuelle Amplifizierungsvorteile zu eliminieren. Für PP_{unb} werden nach der Normierung aber immer noch 635.000 Peptide erhalten, wobei die Sequenzen mit hohen normierten Häufigkeiten durch die Sanger-Sequenzierung nicht gefunden werden konnten (Abbildung 32).

Bei einem Vergleich beider Sequenziermethoden muss zusätzlich die Art des verwendeten Phagendisplay-Targets betrachtet werden. Weit verbreitet ist Phagendisplay zur Selektion spezifischer Binder für biologische Targets wie Proteine oder Antikörper (Kapitel 2.4.2). Das Targetprotein wird dabei auf einer Oberfläche immobilisiert und anschließend mit der Phagenbibliothek inkubiert. In diesem Fall sind durch die definierte Proteinstruktur nur eine stark begrenzte Anzahl bindender Phagenklone möglich, welche eine sehr hohe Affinität für das Targetprotein aufweisen (Abbildung 33). Über mehrere Panning-Runden können diese wenigen stark bindenden Phagenklone angereichert werden. Bei einer anschließenden Sanger-Sequenzierung von lediglich 10^1 - 10^2 Sequenzen können somit bereits stark bindende Peptidsequenzen erhalten werden und oftmals sind auch bei einer geringen Anzahl sequenzierter Klone bereits gemeinsame Bindungsmotive erkennbar.^[129] Wenn Phagendisplay-Screenings auf Materialoberflächen durchgeführt werden, wird die Selektion stark bindender Phagenklone schwieriger. Die Anzahl möglicher Peptidbinder nimmt tendenziell zu und die Affinität der bindenden Sequenzen für das untersuchte Material ist üblicherweise geringer als im Fall von Peptid-Protein-Wechselwirkungen. Im Materialbereich besitzen Einkristalloberflächen die definierteste Oberfläche, wodurch für diese bei einem Phagendisplay-Experiment ähnliche Resultate wie für Protein-Targets erwartet werden können. Beispielsweise zeigten sich bei Phagendisplay-Experimenten mit Silicium- und Galliumarsenid-Einkristallen bereits nach der Sanger-Sequenzierung weniger Phagenklone selektiv bindende Peptidsequenzen und gemeinsame Bindungsmotive.^[78] Bei Verwendung eher heterogener Materialoberflächen, wie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten technischen PP-Folien, sind eine Vielzahl verschiedener Binder möglich, dessen Affinität für die Oberfläche zum Beispiel auch auf Verunreinigungen oder Oberflächendefekte zurückgeführt werden kann. Im Fall der PP-Folien sind die erwarteten Bindungsaffinitäten der selektierten Peptide deutlich geringer als beispielsweise bei Peptid-Protein-Wechselwirkungen. Anstelle weniger starker Binder sind also eine Vielzahl schwacher bis

mittelstarker Binder wahrscheinlich. In diesem Fall wirken sich Amplifizierungstendenzen bestimmter Phagenklone deutlich stärker auf die erhaltenen Sequenzen aus. Einzelne schwach bindende Klone können daher nach wenigen Panning-Runden die gesamte Phagenbibliothek dominieren und die Ergebnisse somit verzerren. Hochdurchsatz-Sequenzierung der vollständigen Phagenbibliothek nach der ersten Panning-Runde und anschließende Normierung der Datensätze, wie in dieser Arbeit durchgeführt, ist daher für eher heterogene Materialoberflächen der Sanger-Methode überlegen.

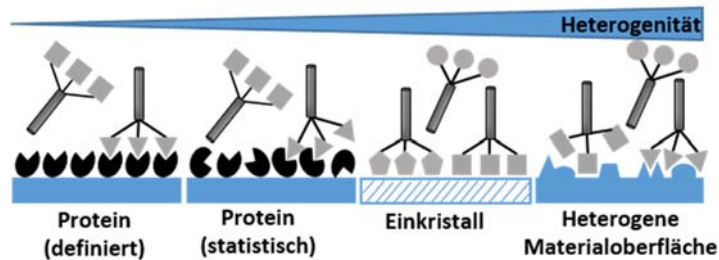


Abbildung 33. Schematische Darstellung verschiedener Phagendisplay-Targets. Für definiert immobilisierte Proteine werden tendenziell wenige stark bindende Phagenklone mit gemeinsamen Bindungsmotiven erhalten, während bei zunehmender Heterogenität des verwendeten Targets eine Vielzahl verschiedener Binder möglich ist und die Identifizierung gemeinsamer Bindungsmotive stark erschwert wird. Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung ist in diesem Fall der Sanger-Sequenzierung überlegen.

3.6 Auswahl geeigneter Sequenzen

Im Folgenden sollten geeignete Peptidsequenzen der Sanger- und Illumina-Datensätze für eine genaue Untersuchung der Bindungseigenschaften synthetisiert werden. Nach der Sequenzierung vollständiger Phagenbibliotheken mit insgesamt fast zwei Millionen verschiedenen potentiell PP-bindenden Peptidsequenzen stellt die vergleichsweise aufwendige Synthese und Untersuchung der Peptide bisher den limitierenden Faktor dar. Eine wohlüberlegte Auswahl der Sequenzen aus den enorm großen Datensätzen ist daher zwingend notwendig. Insgesamt wurden zwölf Peptide ausgewählt, darunter jeweils vier Sequenzen aus dem Sanger-Pool, Illumina-Pool und dem normierten Datensatz (Kapitel 3.5.3.2, Abbildung 29), wobei unter anderem die Sequenzhäufigkeit sowie die Präsenz hydrophober und basischer Aminosäuren als Kriterium galt.

Hierzu wurden zunächst alle Sequenzen ausgewählt, welche über Sanger-Sequenzierungen nach der dritten Panning-Runde auf unbehandeltem PP gefunden wurden (Tabelle 21, Pep_{S1-54}). Darunter ist das Peptid DYHDSLPTLRK, welches für jede der PP-Oberflächen sowohl im Sanger- als auch Illumina-Sequenzpool die dominierende Sequenz darstellt. Die Peptide

GNNPLHVHDKR sowie VCSPCGVPPAK gehören, neben dem Auftreten im Sanger-Pool, ebenfalls zu den häufigsten Sequenzen der Illumina-Datensätze. Dagegen wurde die Sequenz RFFDSEFDVAFH ausschließlich über Sanger-Sequenzierung gefunden und ist mit Kopienzahlen von 2 nach der ersten und zweiten Runde im Illumina-Pool für PP_{unb} praktisch unsichtbar.

Tabelle 21. Für die Synthese als PEG-Konjugate und anschließende Bindungsassays ausgewählte Peptidsequenzen. Farbliche Markierung der Aminosäureklassen (basisch, sauer, hydrophob, polar).

Sequenz	PEG ₃₀₀₀ -Konjugat	Besonderheit
DYHDP ^{sa} SLPTLRK	Pep _{S1} -PEG	Sanger- und Illumina-Pool, häufigste Sequenz
GNNPLHVHDKR	Pep _{S2} -PEG	Sanger- und Illumina-Pool
VCSPCGVPPAK	Pep _{S3} -PEG	Sanger- und Illumina-Pool, Dicystein
RFFDSEFDVAFH	Pep _{S4} -PEG	ausschließlich im Sanger-Pool (3. Runde)
QVNLGLGERSQQM	Pep _{I1} -PEG	Illumina-Pool, sehr häufig
TAKYLPMPRGPL	Pep _{I2} -PEG	Illumina-Pool, sehr häufig
HNDNNTDQTWW	Pep _{I3} -PEG	Illumina-Pool, häufig, hydrophob/Trp-haltig
WCIRCSNLDASW	Pep _{I4} -PEG	Illumina-Pool, häufig, hydrophob/Trp-haltig, Dicystein
SCTLERCMYRNG	Pep _{N1} -PEG	Normierter Sequenzpool, sehr häufig, Dicystein
NFLGAVAKGAIH	Pep _{N2} -PEG	Normierter Sequenzpool, häufig, hydrophob
HVSTTDLLGPRR	Pep _{N3} -PEG	Normierter Sequenzpool, häufig
LYARDVSRYPWHV	Pep _{N4} -PEG	Normierter Sequenzpool, 2x Tyr sowie Arg, hoher FASGAI-Volumenwert

Zusätzlich wurden vier Peptide des Illumina-Sequenzpools nach Häufigkeit sowie Hydrophobie ausgewählt (Tabelle 21, Pep_{I1-14}), wobei die Peptide QVNLGLGERSQQM und TAKYLPMPRGPL zu den fünf häufigsten Sequenzen zählen. Die Sequenzen HNDNNTDQTWW und WCIRCSNLDASW weisen neben hohen Kopienzahlen vermehrt hydrophobe Aminosäuren, vor allem Tryptophan, auf. Wie im Kapitel 3.5.3.1 diskutiert, sind Tryptophan-haltige Peptide bekannte Polystyrolbinder und besitzen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen möglicherweise ebenfalls eine Affinität für PP. Neben Tryptophan enthalten die Illumina-Peptide Pep_{I1-14} die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Leucin, Valin und Isoleucin, dessen Seitengruppen chemische Ähnlichkeit zum PP-Target aufweisen. Bezüglich der Auswahl sehr häufig vorkommender Sequenzen, ist anzumerken, dass Amplifizierungsvorteile in *E. coli* eine starke Bindung auf PP nicht ausschließen. Vorherige Arbeiten lassen darauf schließen, dass solche Sequenzen im Phagendisplay sowohl aufgrund ihrer großen Häufigkeit als auch einer Bindung zum Target selektiert werden.^[93] Die zwingend erforderliche Untersuchung der selektierten Sequenzen in Hinblick auf die Bindungseigenschaften, lässt sich somit auch durch die bessere Statistik der Next-Generation-Sequenzierung nicht überwinden.

Außerdem wurden vier Peptide aus den ersten neun Sequenzen des normierten Datensatzes nach der ersten Panning-Runde auf unbehandeltem PP ausgewählt (Tabelle 21, Pep_{N1-N4}). Durch die Normierung anhand der Referenzbibliotheken wurden neue Sequenzen sichtbar, welche einen reduzierten Amplifizierungsvorteil aufweisen sollten und daher mit höherer Wahrscheinlichkeit starke Binder enthalten. Die Sequenz SCTLERCMYRNG besitzt die höchste normierte Häufigkeit, während die Peptide NFLGAVAKGAIH und HVSTTDLLGPRR außerdem Kopienzahlen im vierstelligen Bereich in den Targetbibliotheken aufweisen. Die Sequenz LYARDVSRYPWHV wurde aufgrund der Präsenz dreier basischer Aminosäuren sowie zweier Tyrosinreste ausgewählt, welche im normierten Datensatz angereichert wurden und eventuell zur Bindung beitragen. Zusätzlich wurde in den Phagenbibliotheken PP_{unb} ein allgemeiner Trend zu Peptidsequenzen mit großen Volumen beobachtet, wobei diese Sequenz ein besonders großes Volumen besitzt.

Weiterhin ist anzumerken, dass jeweils eine Peptidsequenz aus jedem Bereich ein Cysteindipeptid enthält (Pep_{S3}, Pep_{I4}, Pep_{N1}). Das häufige Auftreten dieser Aminosäure in Form von Dicystein kann zwar durch einen Amplifizierungsnachteil einzelner Cysteine erklärt werden, jedoch besitzen zyklische Peptide eine konformativ eingeschränkte Struktur, welche die Bindung entropisch begünstigen könnte, und sollten daher näher untersucht werden.

3.7 Bindungsanalyse ausgewählter Peptidsequenzen

Im nächsten Schritt wurden Bindungsexperimente mit den selektierten Peptidsequenzen auf PP durchgeführt. Dazu erfolgte die festphasengebundene Synthese der 12-mer-Peptide aus Tabelle 21 (Kapitel 3.6) über Standard-Fmoc-Strategie als Peptid-Poly(ethylenglykol) (Peptid-PEG)–Konjugate. PEG ist ein kristalliner thermoplastischer Polyether, welcher sich durch eine hohe Löslichkeit in Wasser auszeichnet und zusätzlich eine sehr geringe Immunogenität und Toxizität aufweist. Aufgrund dieser Eigenschaften werden Materialoberflächen für medizinische Anwendungen mit PEG modifiziert, um die unerwünschte Adsorption von Proteinen zu verhindern.^[130] Außerdem wird PEG als Löslichkeitsvermittler von Wirkstoffen eingesetzt.^[131] Die hohe Wasserlöslichkeit von PEG ist einzigartig für aliphatische Polyether, die üblicherweise nicht wasserlöslich sind.^[132] Zurückzuführen ist diese Eigenschaft auf den Abstand der Sauerstoffatome in der Polymerstruktur des PEG, der mit dem Abstand der Wasserstoffatome im Wassermolekül kompatibel ist.^[133] Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimente dient der abschirmende Effekt des PEG-Segments ($M_{n,PEG} = 3000 \text{ g/mol}$) der Unterdrückung mehrlageriger Peptidschichten und Agglomerationen

sowie der Erhöhung der Wasserlöslichkeit. Somit wird die Interpretation der Messdaten erleichtert und eine bessere Handhabung ermöglicht. Die Biokonjugate wurden an einem PAP-Harz mittels inverser Konjugationsstrategie dargestellt, wobei das Peptid am bestehenden Polymer aufgebaut wird und die Verknüpfung am C-Terminus der Peptidsequenz erfolgt.^[134] Zusätzlich wurden die Biokonjugate N-terminal mit einem Glycin-Abstandshalter versehen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (FAM) markiert, welcher die qualitative und quantitative Analyse der Konjugate auf der PP-Oberfläche vereinfacht (Abbildung 34). Der Abstandshalter soll die strukturelle Flexibilität des Konjugats erhöhen und damit die Peptidsequenz vom Fluoreszenzmarker entkoppeln. Der Einfluss des FAM auf die Bindungsdomäne soll dadurch minimiert werden.

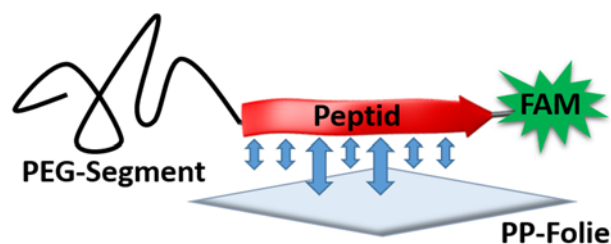


Abbildung 34. Schematische Darstellung der fluoreszenzbasierten Messung markierter Peptid-PEG-Konjugate auf der PP-Oberfläche.

Für die Adsorptions-Experimente wurde die unbehandelte Seite der PP-Folie in einer Stammlösung der Biokonjugate 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit stark verdünnter wässriger Ammoniumhydroxidlösung (pH 9) gewaschen. Der basische pH-Wert soll dabei die Fluoreszenzintensität des Markers maximieren. Anschließend wurde die Fluoreszenz jedes Peptid-PEG-Konjugats direkt auf der PP-Oberfläche gemessen.

Die Resultate der Adsorptions-Experimente nach einem bzw. fünf Waschschritten sind in Abbildung 35 dargestellt. Für Pep_{51} -PEG und Pep_{52} -PEG werden hohe Fluoreszenzintensitäten gemessen, welche einer großen Menge des adsorbierten Peptids entsprechen. Des Weiteren verbleibt Pep_{52} -PEG auch nach fünf Waschschritten in nahezu unveränderter Menge an der PP-Oberfläche. Die beiden Peptidsequenzen sind sowohl in den Sanger- als auch Illumina-Datensätzen dominierend und treten ebenfalls mit hohen Kopienzahlen in den Referenzbibliotheken auf. Die unerwartet starke Adsorption beider Konjugate lässt darauf schließen, dass zusätzlich zu einem Amplifizierungsvorteil starke Bindungseigenschaften für die Sequenzen vorliegen. Eine ähnlich hohe Adsorption wird für Pep_{12} -PEG gemessen, dessen 12-mer Peptidsequenz ebenfalls mit großen Kopienzahlen in den Illumina-Datensätzen auftritt. Die Konjugate Pep_{53-4} -PEG, dessen Sequenzen primär über die Sanger-Methode gefunden wurden, zeigen lediglich eine schwache Adsorption auf PP. Pep_{54} -PEG ist nach fünf

Waschschritten bereits vollständig von der Oberfläche abgewaschen. Die Sequenz enthält vier Phenylalaninreste sowie die ebenfalls hydrophoben Aminosäuren Alanin und Valin. Diese Messungen legen erneut nahe, dass die Hydrophobie nicht das entscheidende Kriterium für die Affinität zu PP darstellt.

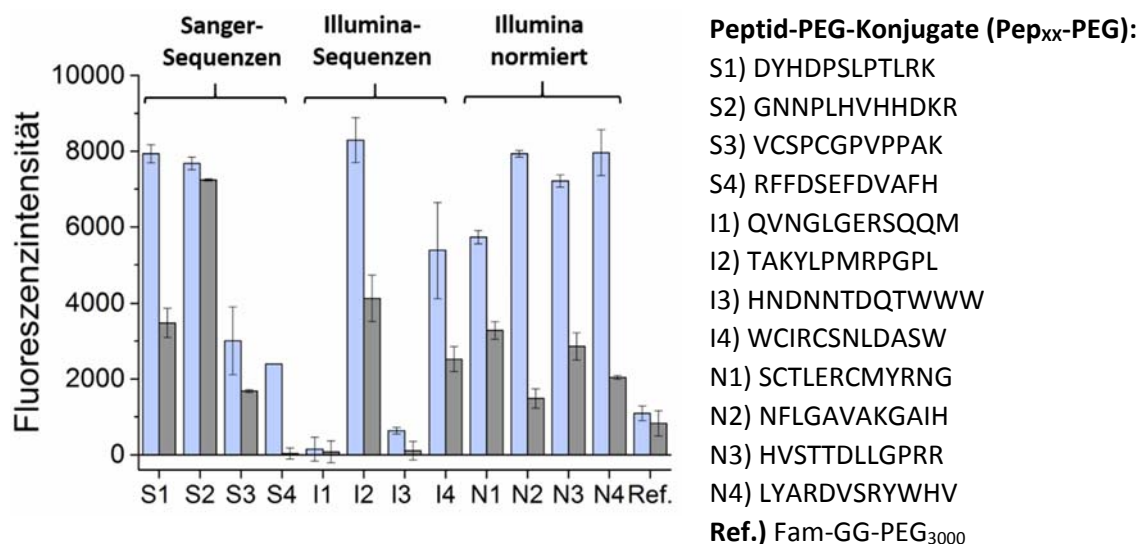


Abbildung 35. Fluoreszenzbasierter Assay zur Untersuchung der Beschichtungseigenschaften ausgewählter Peptide auf PP-Folien. Dargestellt sind die Resultate der Adsorptions-Elutions-Experimente mit verschiedenen Peptid-PEG-Konjugaten auf unbehandelter PP-Folie nach einem Waschschritt (blau) und fünf Waschschritten (grau). (Bedingungen: 30 min Inkubation PP-Folie mit wässriger Stammlösung der Peptid-PEG-Konjugate (100 μ M, pH 7, TBS-Puffer) gefolgt von 1 bzw. 5 Waschschritten mit Wasser, letzter Waschschritt unter Zusatz von 0,0125 Vol.-% wässrigem NH_3 , Fluoreszenzmessung direkt auf der PP-Oberfläche unter Verwendung eines grünen Lasers, Auflösungsfokus bei 50 μ m und 60 μ m, Eigenfluoreszenz der PP-Folie abgezogen).

Darüber hinaus zeigen die aus der Normierung der Illumina-Daten abgeleiteten Peptidsequenzen (Pep_{N1-4}-PEG) eine hohe Adsorption auf PP. Dies impliziert, dass der Normierungsansatz zur Eliminierung falsch positiver Treffer erfolgreich war. Eine hohe normierte Häufigkeit geht offensichtlich mit einer hohen Adsorption der Peptide einher (Tabelle 22). Für die Cystein-haltigen Konjugate Pep_{S3}-PEG, Pep_{I4}-PEG und Pep_{N1}-PEG werden Fluoreszenzintensitäten im mittleren Bereich gemessen. Jedoch haften im Gegensatz zum Großteil der weiteren Konjugate nach fünf Waschschritten noch mindestens 50% der adsorbierten Menge an der Oberfläche. Denkbar ist, dass die durch eine Disulfidbrücke verursachte starrere Struktur der Peptide eine stärkere Bindung der bereits adsorbierten Peptide bewirkt, jedoch nicht zu einer höheren initialen Adsorption führt. Weiterhin ist eine intramolekulare Vernetzung innerhalb der Beschichtung über Disulfidbrücken möglich, welche die höhere Beschichtungsstabilität verursachen könnte.

In Tabelle 22 sind verschiedene Eigenschaften der untersuchten Peptide zusammengefasst. Die Nettoladung sowie der aliphatische Index, welcher das relative Volumen der aliphatischen

Seitenketten beschreibt, korrelieren mit einer starken Adsorption der Peptide auf PP. Für die am stärksten adsorbierenden Peptide werden positive Nettoladungen im Bereich von +1 sowie mittlere bis hohe aliphatische Indizes berechnet. Im Gegensatz dazu zeigen Peptide mit negativen Nettoladungen und niedrigen aliphatischen Indizes keine oder geringe Adsorption auf PP. Hierbei wird ersichtlich, dass hydrophobe Wechselwirkungen nicht das Schlüsselement der Bindung sein können, aber auch nicht vollständig vernachlässigbar sind. Weiterhin legen die Daten nahe, dass das Volumen der aliphatischen Seitenketten eher entscheidend ist als die Hydrophobie des gesamten Peptids. Darüber hinaus scheinen insbesondere ionisierte Aminosäuren über elektrostatische Adsorption für die Bindung an PP von Bedeutung zu sein.

Tabelle 22. Ausgewählte Eigenschaften der 12-mer Peptide. Sequenzen sind nach gemessener Adsorption auf PP_{unb} geordnet, beginnend mit dem am stärksten adsorbierenden Peptid. (Bedingungen für die Berechnung: Fluoreszenzintensität aus Abbildung 35 bestimmt; normierte Häufigkeit nach Berechnung in Kapitel 3.5.2.3; Wasserlöslichkeit und Nettoladung über Online-Peptide-Property-Calculator vorhergesagt bzw. berechnet^[135]; geladene Aminosäuren: Arg, Asp, Glu, His, Lys; hydrophobe Aminosäuren: Ala, Cys, Gly, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Val; GRAVY-Index und Aliphatischer Index wie in Kapitel 3.5.5 berechnet.)

Sequenz	Fluo- reszenz auf PP	Norm- ierte Häufig- keit	Löslich- keit in Wasser	Ge- lad- ene AS	Hydro- phobe AS	Netto- ladung bei pH 7	Hydro- phobie (GRAVY Index)	Alipha- tischer Index
TAKYLPMRPGPI(I2)	8294	6,5	schlecht	17%	42%	1,99	-0,36	73,3
LYARDVSRVWHV(N4)	7960	71	schlecht	33%	42%	1,09	-0,50	89,2
NFLGAVAKGAIH(N2)	7931	92	schlecht	17%	75%	1,09	0,78	114,2
DYHDPSTLPTLRK(S1)	7933	7,3	gut	42%	17%	0,09	-1,42	65,0
GNNPLHVHHDKR(S2)	7678	2,4	gut	50%	25%	1,27	-1,88	56,7
HVSTTDLLGPRR(N3)	7212	77	gut	33%	33%	1,09	-0,68	89,2
SCTLERCMYRNG(N1)	5731	140	gut	25%	42%	0,87	-0,71	32,5
WCIRCSNLDASW(I4)	5383	0,9	schlecht	17%	58%	-0,13	0,02	73,3
VCSPCGPVPPAK(S3)	3009	2,0	schlecht	8%	50%	0,88	0,31	56,7
RFFDSEFDVAFH(S4)	2397	3,5	schlecht	42%	50%	-1,91	-0,15	32,5
HNDNNTDQTWWW(I3)	637	0,8	schlecht	25%	25%	-1,91	-2,36	0
QVNGLGERSQQM(I1)	149	1,8	gut	17%	42%	0,00	-1,14	56,7

Des Weiteren wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Adsorption einiger Peptid-Polymer-Konjugate auf PP untersucht (Abbildung 36). Dafür wurde die PP-Folie jeweils in einem basischen TRIS-Puffer (pH 9), einem neutralen TBS-Puffer (pH 7) oder einem sauren Citratpuffer (pH 5) mit den Biokonjugaten inkubiert. Für die untersuchten Sequenzen wurde nach Inkubation bei neutralem pH die höchste Fluoreszenz gemessen. Im Basischen bei pH 9 werden deutlich niedrigere Fluoreszenzintensitäten für die meisten Peptide mit Ausnahme

der Sequenzen S1, S2 und N4 ermittelt. Bei pH 5 sind die Fluoreszenzintensitäten der meisten Konjugate noch geringer. Zwei Effekte spielen hierbei eine Rolle: Die Änderungen der PP-Oberflächenladung, sowie die Nettoladungen der Peptidsequenzen. Wenn positive Ladungen der Peptide für eine elektrostatische Adsorption an die PP-Oberfläche verantwortlich sind, würden beispielsweise Histidin-haltige Sequenzen durch höhere positive Ladungen bei pH 5 noch stärker binden (pK_s der Histidin-Seitengruppe = 6,6^[136]). Für die übrigen Peptidsequenzen wäre aufgrund der unveränderten Nettoladung bei einer Absenkung des pH-Werts von pH 7 auf pH 5 zumindest keine Abnahme der Adsorption zu erwarten. Dass dennoch eine verringerte Adsorption auftritt, ist durch die ebenfalls stattfindende Erhöhung der Oberflächenladung der PP-Folie zu erklären. In der Literatur sind Zeta-Potentialmessungen technischer Polyolefin-Materialien beschrieben, welche diesen Effekt bestätigen.^[137] Insbesondere im Bereich von pH 6 bis pH 3 führt eine Absenkung des pH-Werts zu einer deutlichen Erhöhung des Zeta-Potentials auf einer PP-Oberfläche.^[137b] Negative Ladungsträger auf der PP-Oberfläche, wahrscheinlich vor allem Carboxylate, werden protoniert und die Bindung der Peptide wird aufgrund der verringerten elektrostatischen Wechselwirkung erschwert. Im basischen Milieu sinken die Nettoladungen der Peptide, wodurch die Adsorption ebenfalls erschwert wird. Jedoch adsorbieren die Sequenzen, welche selbst bei pH 9 positive Nettoladungen besitzen (S2, I2 und N4) besser an die PP-Oberfläche als solche mit negativen (N1, I4) oder neutralen (N2, N3) Nettoladungen bei pH 9.

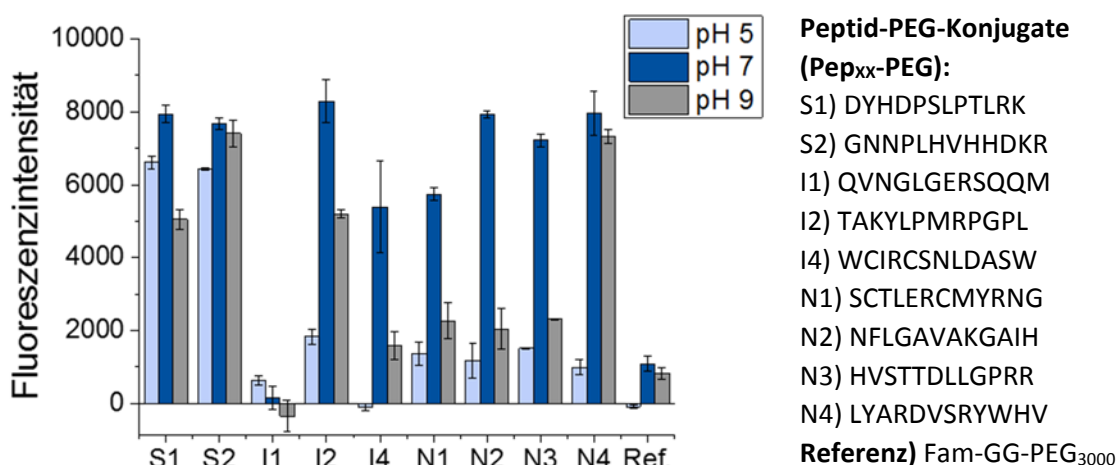


Abbildung 36. Fluoreszenzbasierter Assay zur Untersuchung der Beschichtungseigenschaften ausgewählter Peptide auf PP-Folien bei Variation des pH-Werts. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität adsorbierter Peptid-PEG-Konjugate auf unbehandelter PP-Folie bei verschiedenen pH-Werten nach einem Waschschrift. (Bedingungen: 30 min Inkubation PP-Folie mit wässriger Stammlösung der Peptid-PEG-Konjugate (100 μ M, Citratpuffer (pH 5)/TBS-Puffer (pH 7)/Tris-Puffer (pH 9)) gefolgt von einem Waschschrift mit Wasser unter Zusatz von 0,0125 Vol.-% wässrigem NH_3 , Fluoreszenzmessung direkt auf der PP-Oberfläche unter Verwendung eines grünen Lasers, Auflösungsfokus bei 50 μ m und 60 μ m, Eigenfluoreszenz der PP-Folie abgezogen).

Um Einblicke in die Mechanismen zu erhalten, welche zu einer höheren oder niedrigeren Adsorption auf PP führen, wurde ein Serin-Scan anhand der Sequenz LYARDVSRVWHV (N4) durchgeführt. Diese Sequenz wurde aufgrund der hohen gemessenen Adsorption auf PP bei neutralen und basischen pH-Werten und der guten Beschichtungsstabilität ausgewählt. Zusätzlich erlaubt die Präsenz mehrerer basischer sowie hydrophober Reste in der Sequenz die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Aminosäureklassen auf die Bindung. Durch eine quantitative Messung konnte ferner die Oberflächenbedeckung des Konjugates Pep_{N4}-PEG auf PP abgeschätzt werden. Hierfür wurde das Konjugat mit Ethanol von der Oberfläche entfernt und die Konzentration in Lösung bestimmt. Unter der Annahme einer Monoschicht und eines statistischen Knäuels wurde eine Bedeckung der Oberfläche von 85% berechnet (Berechnung in Kapitel 6.4.5).

Für den Serin-Scan wurden zwölf FAM-Peptid-Konjugate synthetisiert, wobei Serin jeweils systematisch eine der Aminosäuren des Peptids N4 ersetzt. Adsorptionsexperimente mit diesen zwölf Sequenzvarianten zeigten, dass die Adsorption fast vollständig unterdrückt wird, sofern der Austausch einer der beiden Argininreste erfolgt (Abbildung 37). Der Austausch der ebenfalls basischen Aminosäure Histidin führt zu einer Reduktion der Adsorption um 50%. Arginin ist demnach für die Adsorption von größerer Bedeutung als Histidin. Im Gegensatz dazu wird die Adsorption auf PP gar verstärkt, wenn Asparaginsäure durch Serin ausgetauscht wird. Offensichtlich wirkt sich die saure Aminosäure negativ auf die Adsorption aus. Hierzu ist anzumerken, dass in den NGS-Daten eine allgemeine Unterdrückung saurer Aminosäuren beobachtet wurde, während basische Aminosäuren angereichert wurden (Abbildung 27; 29). Im Rahmen von Kontrollexperimenten wurden zwei Konjugate synthetisiert, in welchen jeweils ein Arginin durch die ähnlich basische Aminosäure Lysin (Pep_{N4R4K}-PEG, Pep_{N4R8K}-PEG) ausgetauscht wird (Abbildung 37). In beiden Positionen führte dies zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Adsorption, womit die Bedeutung Arginins bestätigt wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht die basischen Funktionen allgemein, sondern vor allem die Guanidinogruppe Arginins einen entscheidenden Beitrag zur Bindung leistet. Interessanterweise stimmt dies mit den von Schwaneberg veröffentlichten Ergebnissen zur Bindung von antimikrobiellen Peptiden auf PP überein (Kapitel 2.4.1).^[71b] Schwaneberg identifizierte Schlüsselpositionen für die PP-Bindung über gerichtete Evolution. Die Einführung von Argininresten an zwei dieser Schlüsselpositionen führte zu einer etwa fünffachen Verstärkung der PP-Bindung.

Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen scheinen die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Alanin und Valin die Adsorption nur leicht zu beeinflussen, wenn diese einzeln durch Serin ausgetauscht werden. Ein Kontrollpeptid, bei dem alle drei

Leucin- und Valinreste durch das weniger hydrophobe Alanin (Pep_{N4A}-PEG) ersetzt wurden, zeigt jedoch keine Adsorption. Bezüglich der Aminosäure Tyrosin, welche im Peptid N4 an den Positionen 2 und 9 vorkommt, führte der Serin-Scan nicht zu eindeutigen Resultaten. Einerseits verstärkt der Tyrosinaustausch in Position 2 die Adsorption, während diese andererseits durch den Austausch in Position 9 abgeschwächt wird. Um den Einfluss Tyrosins auf die Bindung genauer zu untersuchen, wurden zwei weitere Kontrollsequenzen synthetisiert. In einer der Peptide ist Tyrosin von Position 2 nach 4 verschoben (Pep_{N4Y4}-PEG) und im anderen sind Arginin und Serin in Position 7 und 8 vertauscht, um Arginin und Tyrosin zu trennen (Pep_{N4S-R}-PEG). Vermutet wurde, dass Kation- π -Interaktionen zwischen Tyrosin und dem benachbarten Arginin die Bindung auf PP abschwächen. Eine verstärkte Adsorption kann bei Pep_{N4Y4}-PEG jedoch nicht beobachtet werden. Für beide Konjugate nimmt die Menge an adsorbiertem Peptid um mehr als 50% ab. Dies ist ein Indiz dafür, dass die ursprüngliche Sequenz von Bedeutung ist und die veränderten Positionen beispielsweise über eine Störung der dreidimensionalen Struktur zum Verlust der Bindungskraft führen.

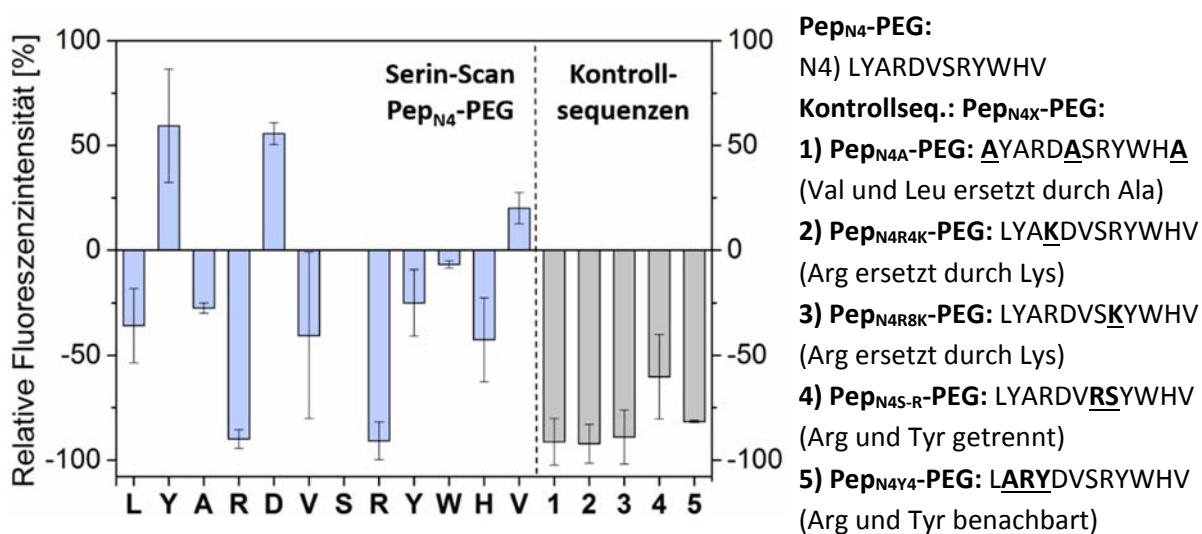


Abbildung 37. Untersuchung des Beitrags einzelner Aminosäuren zur Bindung auf PP-Folien mittels Serin-Scan der Sequenz N4. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Peptid-PEG-Konjugate auf unbehandelter PP-Folie nach einem Waschschrift. Bei Austausch von Arg₄ oder Arg₉ kommt es zum vollständigen Verlust der Bindungskraft der Peptidsequenz. (Bedingungen: 30 min Inkubation PP-Folie mit wässriger Stammlösung der Peptid-PEG-Konjugate (100 μ M, pH 7) gefolgt von einem Waschschrift mit Wasser unter Zusatz von 0,0125 Vol.-% wässrigem NH₃, Fluoreszenzmessung direkt auf der PP-Oberfläche unter Verwendung eines grünen Lasers, Auflösungsfokus bei 50 μ m und 60 μ m, Eigenfluoreszenz der PP-Folie abgezogen).

Denkbar ist auch ein kooperativer Bindungsmechanismus mit Beteiligung beider Arginin-Seitengruppen, da der Austausch eines Argininrests nicht nur zu einem Bindungsverlust von jeweils 50% führt, sondern einen starken Verlust der Bindungskraft von ca. 80% bewirkt. Der

Positionswechsel eines Arginins (Pep_{N4Y4}-PEG, Pep_{N4S-R}-PEG) führt dagegen zu einer starken aber nicht vollständigen Reduktion der Adsorption. Die Interaktion der Argininreste wird durch die größere oder geringere Distanz erschwert, ist aber noch möglich, während dies bei Verlust einer Argininfunktion nicht der Fall ist.

Anhand der fluoreszenzbasierten Experimente sowie der Ergebnisse der XPS-Messungen (Kapitel 3.1) auf der unbehandelten PP-Oberfläche wird deutlich, dass mindestens zwei Komponenten zur Bindung beitragen. Mittels XPS wurde die Präsenz von C-O- sowie C=O-Spezies auf der PP-Oberfläche nachgewiesen, welche in Form von Alkoholen, Carbonylen oder Carboxylaten vorliegen können. Der Serin-Scan der Sequenz N4 zeigt darüber hinaus einen entscheidenden Beitrag der Aminosäure Arginin, bei dessen Austausch durch Serin keine Adsorption des Peptids mehr stattfindet. Die Daten legen nahe, dass insbesondere elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Guanidinogruppe Arginins und negativ geladenen Carboxylgruppen oder anderen Ladungsträgern auf der Oberfläche, sowie Wasserstoffbrücken zwischen diesen Gruppen zur Bindung beitragen. Solche Wechselwirkungen basierend auf ionisierten Amino- und Carboxylgruppen, welche sowohl auf einer ionischen Komponente als auch auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen, werden als Salzbrücken bezeichnet.^[138] Adsorptionsexperimente mit der Sequenz N4 unter basischen und sauren Bedingungen stützen diesen hypothetischen Mechanismus. Bei einem pH-Wert von 5, bei welchem die Carboxylgruppen an der Oberfläche protoniert wären, nimmt die Fluoreszenzintensität des Peptid-Konjugats auf PP um ca. 90% ab, während sie bei einem pH-Wert von 9 nahezu konstant bleibt (Abbildung 36).

Zusätzlich legen die gewonnenen Ergebnisse nahe, dass auch Wechselwirkungen hydrophober Aminosäureseitenketten mit der PP-Oberfläche zur Bindung der Peptide auf PP beitragen. Diese spielen im Vergleich zu ionischen Wechselwirkungen eine untergeordnete Rolle. Größenordnungen der Bindungsstärke von Salzbrücken in Proteinen liegen meist im Bereich von ca. 8,4 kJ/mol, können aber auch 42 kJ/mol oder mehr betragen.^[139] Dagegen liegt der Energiegewinn durch die Wechselwirkung einer Methylgruppe mit einer hydrophoben Proteintasche bei nur etwa 3 kJ/mol.^[140] Die Gesamtheit der hydrophoben Wechselwirkungen scheint jedoch durchaus entscheidend zur Bindung beizutragen. Der Serin-Scan und die Kontrollsequenz Pep_{N4A}-PEG verdeutlichen dies. Der Austausch einzelner hydrophober Aminosäuren durch Serin führt zu einer Reduktion der Adsorption um lediglich 25 - 30%. Der Ersatz Leucins und zweier Valin-Reste durch Alanin bewirkt dagegen den vollständigen Verlust der Bindungskraft des Peptids. Darüber hinaus zeigen die Kontrollsequenzen (Abbildung 37), dass auch die Sequenz der Aminosäuren entscheidend ist. Verschiebungen einzelner Arginin

bzw. Tyrosinfunktionen zu anderen Positionen führen zu einer fast vollständigen Reduktion der Adsorption.

Der Einfluss basischer Aminosäuren, insbesondere Arginin, auf die Bindung der Peptidsequenzen war zunächst unerwartet. Hierbei wird der entscheidende Vorteil des Phagendisplay im Vergleich zu rationalen Ansätzen deutlich. Die Adhäsion der Peptide ist stärker abhängig von lokalen Gegebenheiten der Oberfläche, beispielsweise der Präsenz sauerstoffhaltiger funktioneller Gruppen, als von globalen Eigenschaften, wie der Hydrophobie. Durch Phagendisplay wird die reale Oberfläche des Targets lokal auf wenigen Nanometern mitsamt aller Facetten, einschließlich der Kristallinität, Verunreinigungen und Oberflächendefekten ausgelesen.

3.8 Charakterisierung der Adhäsion

Neben fluoreszenzbasierten Messungen erfolgten Adhäsionsstudien der 12-mer-Peptide in Kooperation mit Dr. Maximilian Seuss aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fery am Leibnitz Institut für Polymerforschung in Dresden. Die Methode basiert auf der Kolloid-Sonden-Rasterkraftmikroskopie (*engl. colloidal probe AFM*) und ermöglicht Aussagen über die Bindungsstärke der Peptide auf der PP-Oberfläche. Als kolloidale Sonden wurden sphärische Goldpartikel mit einem Durchmesser von 16 µm eingesetzt, welche an einen AFM-Cantilever geklebt wurden (Abbildung 38). Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Aufnahmen der nicht-funktionalisierten Partikel zeigen eine leichte Oberflächenrauigkeit. Untersucht wurde das Peptid Pep_{N4}, da sich diese Sequenz durch eine hohe Adsorption auf PP auszeichnet sowie im Vergleich zu anderen untersuchten Sequenzen besondere elektronische und sterische Eigenschaften aufweist (Kapitel 3.5.5/3.6). Zusätzlich wurden zwei gescrambelte Versionen der Sequenz N4, die Peptide HRWYLRAVVDSY (N4s) und DASLYVRHWVR (N4s2) untersucht. Die Sequenz N4s ist bewusst gewählt worden, da sich die basischen Reste vorwiegend am N-terminalen Ende des Peptids befinden. Diese Eigenschaft wird aufgrund der Amplifizierungseffekte im Phagendisplay-Screening stark unterdrückt. Peptide mit basischen Gruppen am N-terminalen Ende werden daher kaum selektiert, obwohl solche Sequenzen durchaus starke Binder darstellen können. Die Sequenz N4s2 wurden dagegen vollkommen zufällig mithilfe eines Algorithmus erzeugt und ausgewählt.^[141] Die Synthese der genannten Peptidsequenzen erfolgte an der Festphase über Standard Fmoc-Strategie, wobei die Sequenz C-terminal durch einen Cysteinrest sowie einen Triglycin-Abstandshalter erweitert wurde. Dies führte zu den Sequenzen LYARDVSRVYWHV-GGGC (Pep_{N4-C}), HRWYLRAVVDSY-GGGC

(Pep_{N4s-C}) und DASLYVRHWVR-GGGC (Pep_{N4s2-C}). Die Seitengruppe der Aminosäure Cystein ermöglicht die Modifizierung der Kolloidsonden mit den Peptiden über eine Thiol-Gold-Bindung. Eine solche Bindung gehört mit Bindungsenergien von 50 kJ/mol bis 150 kJ/mol^[142] zu den stärksten nicht-kovalenten Bindungen und wird zum Beispiel häufig verwendet um thiolmodifizierte Alkylketten als sogenannte selbstassemblierende Monolagen an Goldoberflächen zu binden.^[143]

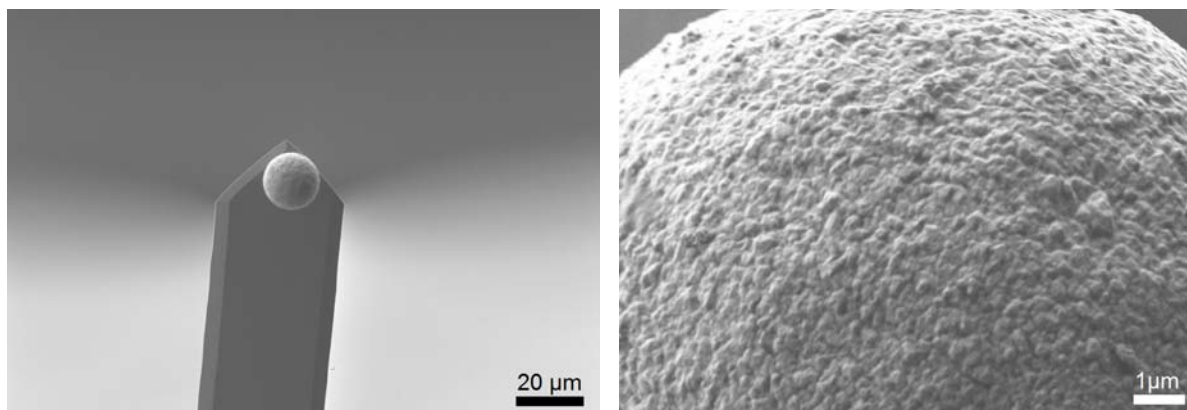


Abbildung 38. REM-Aufnahmen zeigen beispielhaft einen nicht-funktionalisierten sphärischen Goldpartikel (\varnothing 16 μm), welcher auf den AFM-Cantilever geklebt und nach Peptid-Funktionalisierung als kolloidale Sonde verwendet wurde. Durch die geringe Oberflächenrauigkeit im Bereich von 5 nm wurde die Eignung der Partikel für die Rasterkraftmikroskopie-Messungen bestätigt.

Die Funktionalisierung der Sonden erfolgte über Tauchbeschichtung (100 Sekunden) aus einer wässrigen Peptidlösung. Unmittelbar danach wurden die Proben in entionisiertem Wasser gewaschen, um überschüssige Mengen des adsorbierten Peptids zu entfernen. Das Messprinzip ist in Abbildung 39 dargestellt. Die Adhäsionskräfte wurden für die unbehandelte Seite der gleichen PP-Folie bestimmt, welche für das Phagendisplay verwendet wurde (Protec-104, KWH Plast Schur Flexibles Ltd, Jakobstad, Finnland). Die PP-Folie wird zunächst mit Heißkleber in einer Flüssigkeitszelle fixiert, welche anschließend mit TBS-Puffer (pH 7,5) gefüllt wird. Direkt nach der Befüllung wird der Cantilever in die Messlösung eingebracht. Die Peptid-funktionalisierte kolloidale Sonde am Cantilever wird nun wiederholt in Kontakt mit der PP-Folie gebracht und anschließend wieder gelöst. Während der Messungen wird die Auslenkung des Cantilevers über optische Sensoren gemessen.^[144]

Alle Messungen wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Zunächst wurde die Kontaktzeit zwischen 0 und 60 Sekunden bei konstanter Anpresskraft variiert (2 nN). Im nächsten Schritt erfolgte die Variation der Anpresskraft von 5 nN bis 50 nN bei konstanter Kontaktzeit. Dabei wurden alle Messungen an drei verschiedenen Punkten auf der Folie durchgeführt und mehrfach wiederholt.

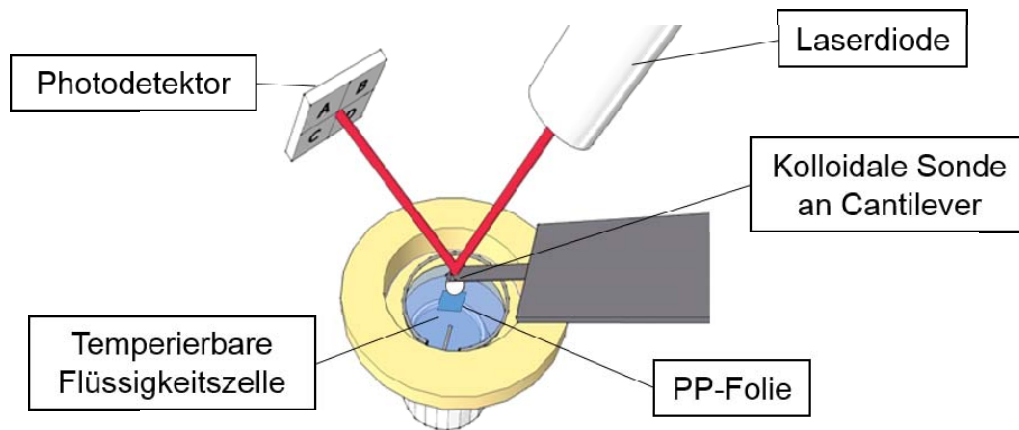


Abbildung 39. Schematischer Aufbau der Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie zur Messung von Adhäsionskräften der Peptide auf PP. Verwendet mit Genehmigung von Prof. Dr. Andreas Fery.^[144]

Die Rohmessdaten werden als Spannung der Photodiode gegen die Cantilever-Position erhalten und werden anschließend in Kraft-Abstands-Kurven umgewandelt (Abbildung 40).^[145] Hierfür wird die Spannung über die Empfindlichkeit des Cantilevers (Inverse Optical Lever Sensitivity InvOLS), welche der Steigung der Kurve entspricht, in eine Bewegung in Meter umgerechnet und über das Hooke'sche Gesetz mit der Federkonstanten des Cantilevers multipliziert um die Kraft zu erhalten.^[146] Für die Auslenkung des Cantilevers muss ein Nullpunkt definiert werden, welcher dem Kontaktpunkt der kolloidalen Sonde mit der Probe entspricht. Aus der resultierenden Kurve kann die Adhäsionskraft abgelesen werden, welche definiert ist als größte Rückstellkraft beim Entfernen des Cantilevers von der Oberfläche. Im dargestellten Beispiel entspricht die Adhäsionskraft demnach ca. 10 nN (Abbildung 40). Weiterhin kann die Adhäsionskraft zur besseren Vergleichbarkeit in die flächenbezogene Adhäsionsarbeit umgerechnet werden. Hierzu wurde das JKR-Modell (Johnson, Kendall, Roberts) verwendet, welches einen simplen Zusammenhang zwischen Adhäsionskraft und Adhäsionsarbeit herstellt (Gleichung 2).

$$W = \frac{2F}{3\pi R} \quad \text{Gleichung (2)}$$

F = Adhäsionskraft; W = Adhäsionsarbeit; R = Radius der kolloidalen Sonde

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie unter Variation der Anpresskraft und der Kontaktzeit auf drei verschiedenen Stellen der PP-Folie für drei Peptidsequenzen dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht dabei der Adhäsionskraft, welche unter den gewählten Bedingungen aus der Kraft-Abstands-Kurve bestimmbar ist. Für Pep_{N4-C} wurden mit 3 - 30 nN die höchsten Adhäsionskräfte auf PP gemessen. Dabei steigt die

Adhäsion mit steigender Kontaktzeit für die verschiedenen Anpresskräfte. Eine Ausnahme bilden Kontaktzeiten zwischen 0 und 5 Sekunden, bei welchen leicht abnehmende Adhäsionskräfte ermittelt werden. Möglicherweise ist in diesem Zeitrahmen der Kontakt noch ungleichmäßig ausgeprägt oder die kontaktfreie Zeit ist zu gering für die Reorientierung der Peptide an der Oberfläche. Weiterhin ist eine Zunahme der Adhäsion mit steigender Anpresskraft zu beobachten, wobei jedoch eine große Streuung der Messwerte auftritt. Im Vergleich zu Messungen mit nicht-funktionalisierten Sonden, für welche Adhäsionskräfte im Bereich von 5 nN bestimmt wurden (Kapitel 6.4.6; Abbildung 46), ist ein durchschnittlicher Anstieg der Adhäsionskraft um das Zwei- bis Dreifache je nach gewählten Bedingungen erkennbar. Die Adhäsionsarbeit für $\text{Pep}_{\text{N4-C}}$ liegt nach dem JKR-Modell im Bereich von $0,05 - 0,8 \text{ mJ m}^{-2}$. Für die gescrambelten Peptide $\text{Pep}_{\text{N4s-C}}$ und $\text{Pep}_{\text{N4s1-C}}$ werden niedrigere Adhäsionskräfte im Bereich von 2 – 7 nN gemessen und die daraus resultierende Adhäsionsarbeit beträgt $0,02 - 0,35 \text{ mJ m}^{-2}$. Im Vergleich zu den Referenzmessungen mit nicht-funktionalisierten Sonden ist demnach keine Steigerung der Adhäsionskraft für die gescrambelten Sequenzen sichtbar. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Sequenz für die Bindung des Peptids auf PP entscheidend ist.

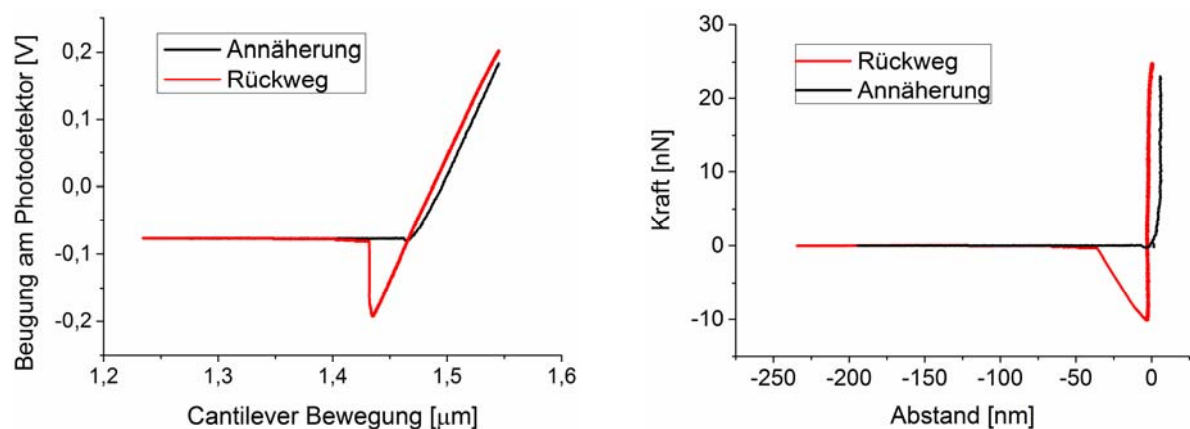


Abbildung 40. Mikroskopische Adhäsionsmessungen der Bindungsdomäne $\text{Pep}_{\text{N4-C}}$ auf PP-Folien. Exemplarische Darstellung der Rohdaten aus Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie (links) und die Umwandlung in eine Kraft-Abstands-Kurve (rechts). Die Adhäsionskraft beträgt $\sim 10 \text{ nN}$. (Bedingungen: Kolloidale Sonden (goldbeschichtet, $\varnothing 16 \mu\text{m}$) am Cantilever über Tauchbeschichtung mit Cystein-Peptid funktionalisiert (1 mM, 100 s). Die AFM-Messung erfolgte in einer Flüssigkeitszelle mit TBS-Puffer (pH 7,5) bei einer Kontaktzeit von 20 s und einer Anpresskraft von 10 nN. Die Rohdaten wurden unter Berücksichtigung der Federkonstante, der Empfindlichkeit (Inverse Optical Lever Sensitivity, InvOLS) und der Cantilever-Auslenkung in die quantitative Kraft-Abstands-Kurve umgewandelt.^[146])

Vergleiche der Adhäsionsarbeit mit anderen Systemen sind im Allgemeinen schwierig, sofern keine identischen Bedingungen gewählt werden. In einer Studie von Minelli wurden SiO_2 -bindende Peptide mittels Kolloidsonden-AFM unter weitgehend ähnlichen Bedingungen

untersucht.^[147] Die 12-mer Peptidsequenzen stammen aus Phagendisplay-Experimenten und wurden ebenfalls mit einem Triglycin-Abstandshalter und Cystein erweitert. Als Sonden wurden Goldpartikel mit geringeren Durchmessern ($1,5 - 3 \mu\text{m}$) verwendet, wobei die Funktionalisierung unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde. Hierbei ist anzumerken, dass die Kontaktfläche für die Berechnung der Adhäsionsarbeit nicht entscheidend ist, da bei einem höheren Radius der verwendeten Sonden auch höhere Adhäsionskräfte gemessen werden und das Verhältnis von Kraft zu Arbeit somit gleichbleibt. Die von Minelli gemessene Adhäsionskraft der Peptide auf SiO_2 von ca. 160 pN ergibt nach Gleichung (2) eine Adhäsionsarbeit von $0,01 - 0,02 \text{ mJ m}^{-2}$. Im Vergleich dazu liegt die Adhäsionsarbeit von $\text{Pep}_{\text{N4-C}}$ um eine Größenordnung höher.

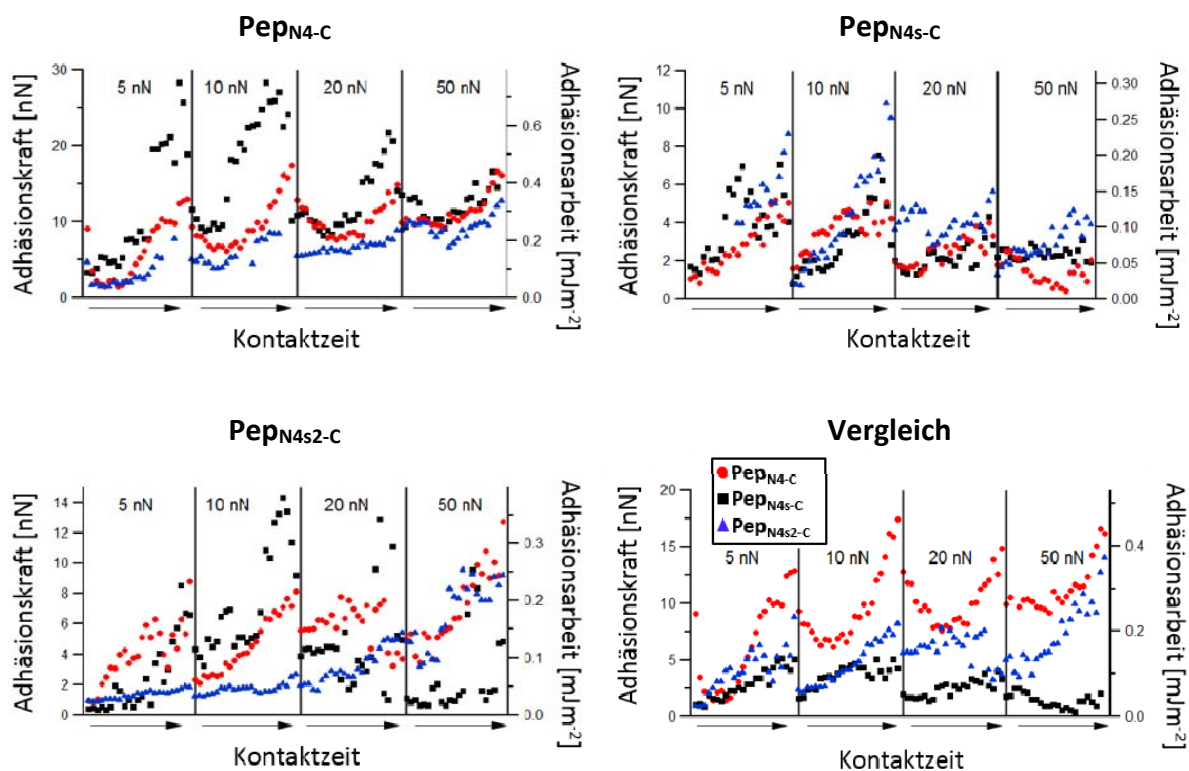


Abbildung 41. Mikroskopische Adhäsionsmessungen der Bindungsdomäne $\text{Pep}_{\text{N4-C}}$ im Vergleich mit den gescrembelten Peptidsequenzen $\text{Pep}_{\text{N4s-C}}$ und $\text{Pep}_{\text{N4s2-C}}$ auf PP-Folien. Die Adhäsionskräfte und Adhäsionsarbeit der Peptide auf PP_{unb} wurden bei verschiedenen Kontaktzeiten (0 s, 1 s, 2 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 60 s) und Anpresskräften (5-50 nN) an drei verschiedenen Stellen der PP-Folie bestimmt (jeweils farblich markiert). Jeder Datenpunkt entspricht dabei der Adhäsionskraft, welche aus einer Kraft-Abstands-Kurve (siehe Abbildung 40) ermittelt wurde. Für den Vergleich der Peptidsequenzen wurde jeweils die Messung an einer Stelle der PP-Folie ausgewählt. (Bedingungen: Kolloidale Sonden (goldbeschichtet, $\varnothing 16 \mu\text{m}$) am Cantilever über Tauchbeschichtung mit Cystein-Peptiden funktionalisiert (1 mM, 100 s). Die AFM-Messungen erfolgten in Flüssigkeitszellen mit TBS-Puffer (pH 7,5). Die Rohdaten wurden unter Berücksichtigung der Federkonstante, der Empfindlichkeit (Inverse Optical Lever Sensitivity, InvOLS) und der Cantilever-Auslenkung in quantitative Kraft-Abstands-Kurven umgewandelt^[146] und die Adhäsionsarbeit wurde über das JKR-Modell berechnet.^[145])

3.9 Eignung der Peptide als Haftvermittler

Abschließend soll eine mögliche Anwendung der PP-bindenden Peptide als wasserbasierte Haftvermittler untersucht werden. Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, sind umweltfreundliche, wasserbasierte Systeme für Polyolefinoberflächen bisher kaum realisiert und daher sehr gefragt. Haftvermittler wirken an der Grenzfläche zwischen Polyolefinen und Klebstoff und bilden zu beiden Materialien eine starke Bindung aus. Für die Evaluation eignet sich der Zugversuch, ein genormtes Prüfverfahren, bei welchem die Proben mit definierter Querschnittsfläche bis zum Bruch gedehnt werden. Dabei muss die Kraftübertragung gleichmäßig und stoßfrei erfolgen und mit geringer Geschwindigkeit gesteigert werden. Anstelle einer Zugprüfmaschine wurden diese Experimente in einer Zentrifuge in Kooperation mit Uwe Beck (BAM) durchgeführt. Die LUMIFrac®-Zentrifuge wurde speziell für Zugversuche von der LUM GmbH in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Beck entwickelt (Abbildung 42). Messungen der Haftfestigkeit $\sigma_{A/B}$ können damit einfach und schnell durchgeführt werden, wobei die Zentrifugalkraft F_Z die Testkraft darstellt (Gleichung 3). Die Probe wird im Vergleich zu herkömmlichen Zugversuchen nur einseitig befestigt. Die Haftfestigkeit $\sigma_{A/B}$ wird über eine positionskodierte und drehzahlkorrelierte Erkennung der Bruchereignisse ermittelt (Gleichung 4).

$$F_Z = m \cdot \omega^2 \cdot r \quad \text{Gleichung (3)}$$

$$\sigma_{A/B} = F_Z \cdot A^{-1} \quad \text{Gleichung (4)}$$

F_Z = Zentrifugalkraft; m = Masse; ω = Drehzahl bei Bruch; r = Radius; A = Fläche

Innerhalb einiger Sekunden beschleunigt die Zentrifuge nach einem festgelegten Geschwindigkeitsprogramm bis der Bruch einer Probe eintritt und ermöglicht dabei die Messung von bis zu 8 Proben gleichzeitig. Die Haftfestigkeit wurde auf der gleichen PP-Folie bestimmt, mit welcher das Phagendisplay-Screening durchgeführt wurde (Protec-104, KWH Plast Schur Flexibles Ltd, Jakobstad, Finnland). Als Klebstoff wurde ein niedrigviskoses Methyl-Cyanoacrylat (LOCTITE® 496) verwendet, welches innerhalb von 10 – 30 Sekunden größtenteils aushärtet. Der Klebstoff wird sowohl für Kunststoffe, als auch Metalle empfohlen und eignet sich daher sehr gut für die Anforderungen der Messungen, für welche die PP-Folie an einen Kupfer-Teststempel geklebt werden soll. Die Kupferstempel dienen als Massekörper während der Beschleunigung in der Zentrifuge. Der Messaufbau ist in Abbildung 42 dargestellt. Zunächst wird die PP-Folie auf einer festen Trägerplatte befestigt (1). Dies geschieht ebenfalls durch Kleben, wobei die Probe an dieser Stelle höheren Kräften

standhalten muss als an der zu untersuchenden Bruchstelle. Bricht die Probe zwischen der Trägerplatte und der Folie kann keine Aussage über den Einfluss des Peptids auf die Haftfestigkeit getroffen werden. Um dies zu verhindern wurde an dieser Stelle ein Klebstoff mit höherer Haftfestigkeit auf PP verwendet (LOCTITE® 460). Zusätzlich wurde die Corona-behandelte Folienseite mit einem Primer vorbehandelt. Anschließend konnte die unbehandelte Folienseite mit einer Peptid-Stammlösung inkubiert und anschließend zum Entfernen überflüssigen Peptids gewaschen werden (2). Im letzten Schritt wurde der Teststempel mit einer definierten Menge des Klebstoffs (LOCTITE® 496) versehen und unter Druck auf die Peptidbeschichtete PP-Folie geklebt (3). Nach einer Aushärtung über 24 Stunden wurde die Haftfestigkeit der Proben in der LUMIFrac®-Zentrifuge geprüft.

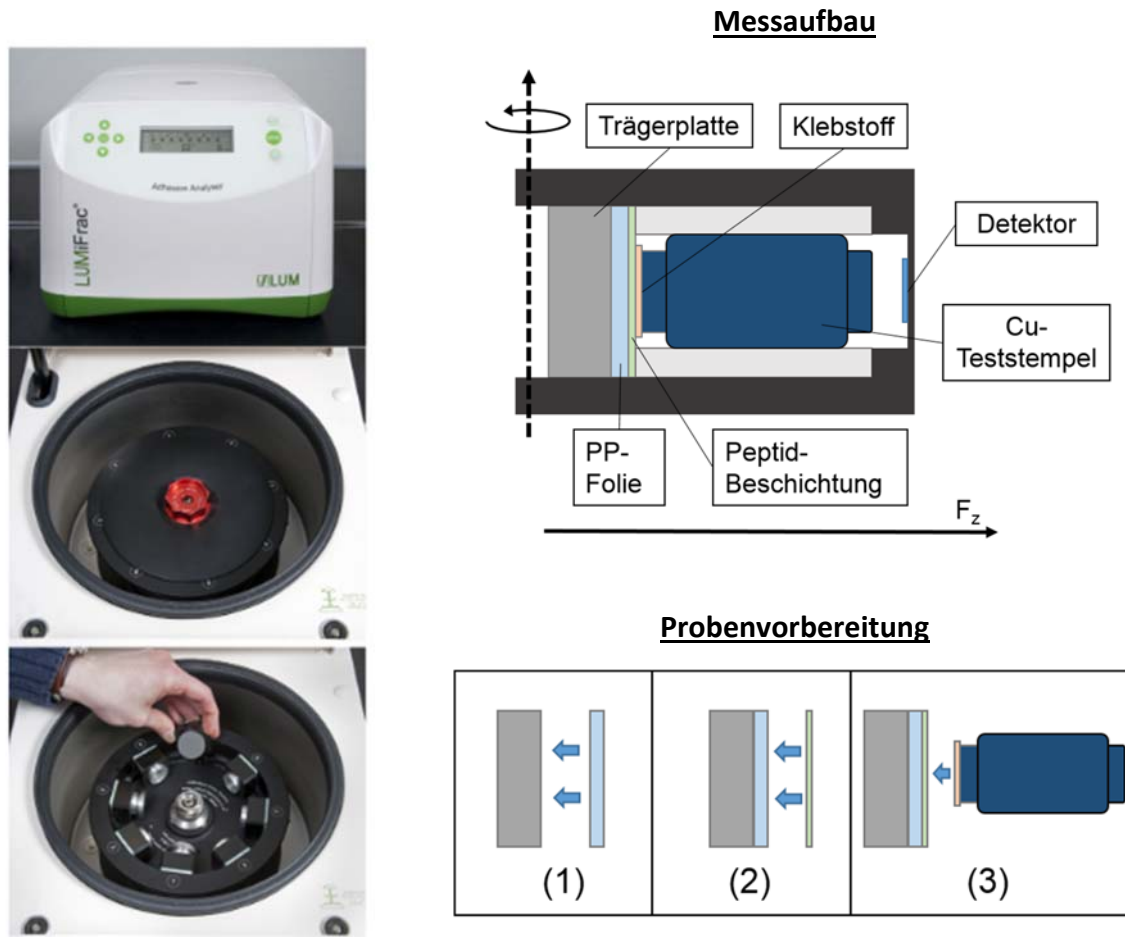


Abbildung 42. Charakterisierung ausgewählter Peptide in Hinblick auf haftvermittelnde Eigenschaften durch Zugversuche. Messungen wurden in einer LUMIFrac®-Zentrifuge durchgeführt (links); Messaufbau und Probenvorbereitung der Zugversuche (rechts). **(1)** PP-Folie wird mit Corona-behandelter Seite auf Trägerplatte geklebt. Vorbehandlung mit Primer: Loctite 770; Klebstoff: Loctite 460 **(2)** Unbehandelte Seite der PP-Folie wird mit Peptid-Stammlösung inkubiert (25 min; 0,3 mg/mL Peptidstammlösung; 3x in Wasser gewaschen); **(3)** Teststempel wird mit Klebstoff Loctite 496 (7 µL) auf PP-Folie geklebt.

Das bereits näher charakterisierte Peptid Pep_{N4} sollte auf die Eignung als Haftvermittler in den Zugversuchen untersucht werden. Hierzu ist anzumerken, dass bewusst keine Untersuchung unter direkter Verwendung der Peptide als Klebstoff durchgeführt wurde. Die kurzen Peptidfragmente weisen hierfür nicht die nötige Kohäsionskraft auf. Erst die Kombination aus Adhäsions- und Kohäsionskräften bildet die Voraussetzung für einen guten Klebstoff. Für die Weiterentwicklung zu Klebstoffen würden daher die intermolekulare Vernetzung der Peptidsequenzen oder die Implementierung wichtiger Bindungsdomänen in polymerisierbare Monomere Ansatzpunkte darstellen, welche jedoch den Rahmen dieser Arbeit übersteigen. Für die Zugversuche wurde die Sequenz sowohl N- als auch C-terminal mit jeweils zwei Lysinen erweitert. Zum einen hat dies den Vorteil einer deutlich verbesserten Löslichkeit in Wasser, welche sich positiv auf die Beschichtung der PP-Folie auswirken kann. Außerdem besitzen die Lysinseitenketten eine chemische Ähnlichkeit zu den industriell verwendeten, Amin-basierten Primern. Die nukleophilen Aminfunktionen stellen Initiatorgruppen für die Polymerisation des Cyanoacrylats dar und beschleunigen somit die Aushärtung. Parallel wurden Kontrollexperimente ohne Peptidbeschichtung durchgeführt, wobei der Stempel direkt mit dem Loctite Klebstoff 496 auf die PP-Folie geklebt wurde.

Bezüglich der optimalen Peptidbeschichtung wurden zunächst verschiedene Peptidkonzentrationen sowie verschiedene Lösungsmittel untersucht. In einem Ansatz sollte eine niedrig konzentrierte Lösung des Peptids in Ethanol (1-10 µg/4 cm²) nach Verdunstung des Lösungsmittels eine dünne Schicht auf der PP-Folie erzeugen. Die auf diese Weise vorbehandelten Proben wiesen jedoch keine erhöhte Haftfestigkeit auf. Auch erhöhte Temperaturen bis maximal 80 °C während der Inkubation zeigten keinen Effekt. Bei Inkubation mit wässrigen Lösungen wurden höhere Konzentrationen (0,1-1 mg/mL) angewendet und die PP-Folie anschließend mit Wasser gewaschen um überschüssiges Peptid zu entfernen. Beschichtungen bei basischen pH-Werten führten schließlich zu einer erhöhten Haftfestigkeit (Abbildung 43).

Für mechanische Klebstofftests ist eine starke Streuung der Messwerte üblich und auch in den hier diskutierten Daten zu beobachten. Bruchereignisse sind typischerweise nicht gut reproduzierbar. Aus diesem Grund wurde die Signifikanz der Messwerte mithilfe einer statistischen Methode (t-Test) berechnet, wobei ausschließlich Messwerte mit einem Signifikanzlevel von über 90% betrachtet werden. Wird die Inkubation der PP-Folie mit dem Peptid bei pH 9 bzw. pH 11 durchgeführt, werden signifikant höhere Haftfestigkeiten im Vergleich zur Applikation des Klebstoffs ohne Vorbehandlung erreicht. Für die Peptidbeschichtung bei neutralem oder saurem pH-Wert ist dagegen keine Änderung der Haftfestigkeit zu beobachten (Abbildung 43A). Wie in Kapitel 3.7 erläutert, begünstigt der

basische pH-Wert vermutlich eine negative Oberflächenladung der PP-Oberfläche, welche die Bindung der positiv geladenen Peptidsequenz ermöglicht.

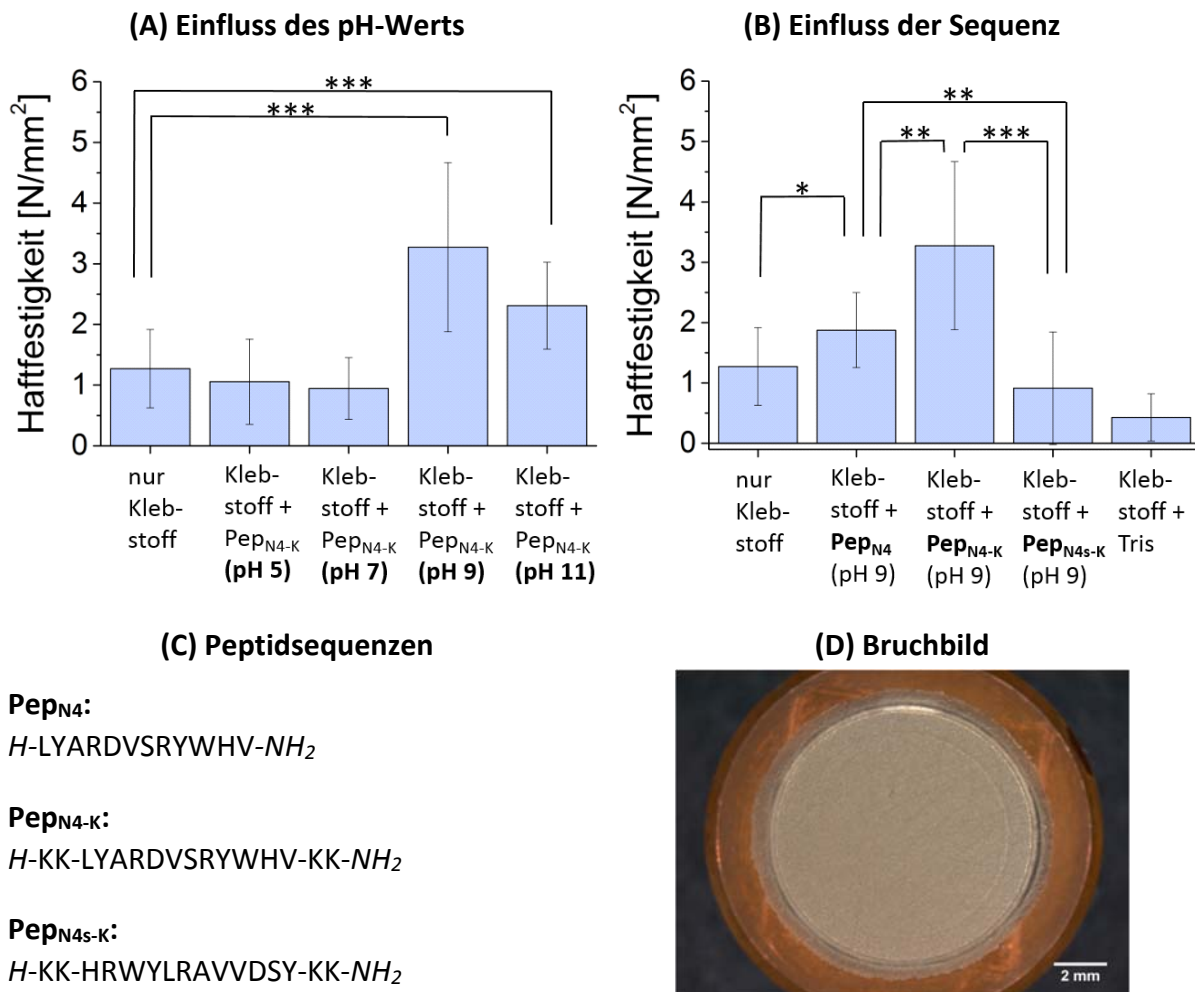


Abbildung 43. Charakterisierung ausgewählter Peptide in Hinblick auf haftvermittelnde Eigenschaften durch Zugversuche auf PP. Untersucht wurde der Einfluss von Peptidbeschichtungen in Kombination mit einem Cyanoacrylat-basierten Klebstoff. **(A)** Inkubation der PP-Folie mit Pep_{N4-K} bei verschiedenen pH-Werten und Kontrollmessung ohne Peptidbeschichtung (nur Klebstoff) **(B)** Inkubation der PP-Folie mit verschiedenen Peptidsequenzen bei pH 9 und Kontrollmessungen ohne Peptidbeschichtung (nur Klebstoff) und (Tris + Klebstoff) **(C)** Untersuchte Peptide. **(D)** Lichtmikroskopisch aufgenommenes Bild der Bruchstelle am Prüfstempel zeigt adhäsives Versagen an PP-Seite bei allen Proben. Die Klebstoffoberfläche zeigt keine Strukturdefekte, sondern verbleibt vollständig am Prüfstempel. (Bedingungen: Klebstoff: Loctite 496, Citratpuffer (pH 5), TBS-Puffer (pH 7), Tris-Puffer (pH 9), Gly/NaOH-Puffer (pH 11), 25 min Inkubation; Peptidstammlösung: 0,3 mg/mL; 3x mit H₂O gewaschen). Die statistische Signifikanz wurde über einen doppelten t-Test ermittelt (P>0,01 für ***; P>0,05 für **; P>0,1 für * entsprechen einer zu 90%, 95% oder 99% signifikanten Differenz).

Weiterhin wurde der Einfluss der Sequenz und der zusätzlich eingeführten Lysinreste untersucht, wobei die Inkubation bei pH 9 in Tris-Puffer erfolgte (Abbildung 43B). Das Peptid Pep_{N4}, welches die unveränderte Sequenz aus dem Phagendisplay-Experiment enthält, bewirkt eine um ca. 25% verstärkte Haftung im Vergleich zur Kontrollmessung ohne Peptid.

Mit der Einführung von vier Lysinresten wird eine um ca. 150% erhöhte Haftfestigkeit erreicht. Dies könnte durch drei mögliche Effekte verursacht werden. (1) Das Lys-Peptid besitzt eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit, wodurch die Beschichtung aus der Lösung erleichtert wird und die PP-Oberfläche vermutlich gleichmäßiger bedeckt ist. (2) Die Aminfunktionen reagieren mit dem Cyanoacrylat, bilden kovalente Bindungen und initiieren die Polymerisation. (3) Lysin verstärkt über die positiv geladenen Aminfunktionen die Bindung des Peptids an PP auf ähnliche Weise wie Arginin. Zum letzten Punkt ist jedoch anzumerken, dass der Austausch von Arginin durch Lysin in Adsorptionsexperimenten zum Verlust der Adhäsion führte (Kapitel 3.7) und höhere Nettoladung somit nicht zwangsläufig optimal sind.

Das Peptid Pep_{N4S-K} stellt eine gescrambelte Version der Sequenz N4 dar und enthält zusätzlich vier Lysinreste. Die Stammsequenz ohne Lysin-Erweiterung zeigte keine signifikant erhöhte Adhäsionskraft in den AFM Messungen (Kapitel 3.8) und besitzt auch mit Lysin-Erweiterung keinen haftvermittelnden Effekt auf PP (Abbildung 43B). Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der Sequenz für die Bindung des Peptids auf PP. Ein Kontrollexperiment, in welchem die PP-Folie lediglich mit Tris-Puffer inkubiert wurde, zeigt ebenfalls keinen haftvermittelnden Effekt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Haftfestigkeit der Peptide auf der Aminbase Tris beruht. Auf der lichtmikroskopischen Aufnahme des Bruchbilds auf der Seite des Teststempels ist eine nahezu ebene Fläche ohne Defekte erkennbar. Dies legt nahe, dass der Klebstoff vollständig auf dem Prüfstempel verblieben ist und ein adhäsives Versagen an der PP-Klebstoff-Grenzfläche stattgefunden hat.

Weiterhin sollte das Resultat mit einem kommerziell erhältlichen Primer verglichen werden. Als Referenz dient der industrielle Primer (LOCTITE® SF 770), welcher speziell zur Vorbehandlung von Polyolefinen oder anderen Materialien mit niedriger Oberflächenenergie eingesetzt wird. Der Loctite Primer verbessert die Haftung von Sofortklebstoffen und wird für die Kombination mit dem verwendeten Cyanoacrylat empfohlen. Die Basis bildet das organische Lösungsmittel n-Heptan, welches zunächst die Quellung von PP bewirkt. Der haftvermittelnde Effekt beruht dann auf verzweigten Aminen mit langen aliphatischen Ketten, welche in das PP diffundieren und zusätzlich die Polymerisation des Klebstoffs initiieren können (Kapitel 2.3.1). Die Ergebnisse der Zugversuche zeigen eine Steigerung der Haftfestigkeit durch den Loctite Primer um ca. 400%, wohingegen das Peptid Pep_{N4-K} eine Verbesserung um 150% erzielt (Abbildung 44). Obwohl die Haftverstärkung des industriellen Primers nicht erreicht werden konnte, zeigen die Ergebnisse doch einen eindeutigen Effekt des Peptids auf die Verbundfestigkeit einer PP-Oberfläche mit Cyanoacrylat-basiertem Sofortkleber. Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung eines Peptids besteht darin, die Vorbehandlung in einem vollständig wasserbasierten System durchführen zu können. Der

Einsatz toxischer organischer Lösungsmittel, welche essentiell für die Wirkung des kommerziellen Primers sind, kann hierdurch vermieden werden. Zusätzlich wurde durch Zugversuche gezeigt, dass die haftverbessernden Effekte eindeutig sequenzabhängig sind. Darüber hinaus sollten auch die verschiedenen Wirkmechanismen betrachtet werden, welche dem haftvermittelnden Effekt zugrunde liegen. Während der Loctite Primer die Bindung an das PP durch Diffusion herstellt und damit zu einer Verschlaufung auf molekularer Ebene führt, ist eine Diffusion des Peptids in das Polymer nicht möglich. Die Adhäsion des Peptids geschieht wie bereits beschrieben wahrscheinlich über Salzbrücken und auch hydrophobe Wechselwirkungen und beruht somit ausschließlich auf nicht-kovalenten Oberflächenwechselwirkungen. Eine um 150% erhöhte Haftfestigkeit bei Kombination des Klebstoffs mit Pep_{N4-K} kann in diesem Zusammenhang als Erfolg gewertet werden.

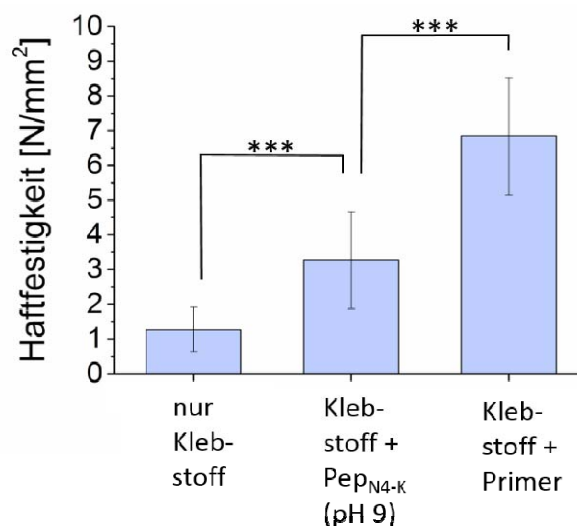


Abbildung 44. Vergleich der haftvermittelnden Eigenschaften von Pep_{N4-K} mit einem kommerziell erhältlichen Primer auf PP. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zugversuche für die Kombination aus Peptidbeschichtung bzw. Primer (Loctite 770) und Cyanoacrylat-basiertem Klebstoff. (Bedingungen: Klebstoff: Loctite 496, Tris-Puffer (pH 9), 25 min Inkubation; Peptidstammlösung: 0,3 mg/mL; 3x mit H₂O gewaschen). Die statistische Signifikanz wurde über einen doppelten t-Test ermittelt ($P > 0,01$ für *** entspricht einer zu 99% signifikanten Differenz).

4. Zusammenfassung

Polyolefine, insbesondere Polyethylen und Polypropylen stellen heutzutage die bedeutendsten Kunststoffe dar. Neben vielen positiven Eigenschaften wie der hohen chemischen Beständigkeit sowie einer schnellen und einfachen Herstellung, stellt aber die Adhäsion auf Polyolefinen eine große Herausforderung dar. Aufgrund der niedrigen Oberflächenenergie stoßen herkömmliche Klebstoffe bei Polyolefinen oft an ihre Grenzen. Gleichzeitig nimmt aber die industrielle Bedeutung des Klebens immer weiter zu. Eine erfolgreiche Haftung auf Polyolefinen setzt typischerweise aufwendige und kostenintensive chemische oder physikalische Vorbehandlungen der Oberfläche voraus. Die Entwicklung wasserbasierter Haftsysteme für schwer klebbare Polyolefine ist daher gefordert.

Ein biokombinatorischer Ansatz stellt eine Möglichkeit zur Generierung Polyolefin-bindender wasserlöslicher Peptide dar, welche auf lokaler Ebene im Nanometerbereich sequenzspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche eingehen können. Die biokombinatorische Methode des Phagendisplay besitzt gegenüber rationellen Methoden einige Vorteile. Vor allem wird die Vielfalt der potentiellen Wechselwirkungen mit der Oberfläche ausgeschöpft, sodass neuartige Peptide mit bisher nicht berücksichtigten Interaktionen entdeckt werden können. Phagendisplay wurde an verschiedenen Polypropylenfolien durchgeführt, wobei insbesondere der Vergleich einer unbehandelten und einer Corona-vorbehandelten Polypropylenoberfläche im Fokus stand. Die DNA-Sequenzierung der auf Polypropylen selektierten Phagenklone erfolgte über die Illumina-Technologie, bei welcher vollständige Phagenbibliotheken sequenziert werden können und Millionen potentiell bindende Sequenzen liefern. Die vorliegende Arbeit beschreibt damit erstmals die Kombination aus Phagendisplay und einer Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungsmethode im materialwissenschaftlichen Bereich. Im Vergleich zur Sanger-DNA-Sequenzierung, womit lediglich einzelne Phagenklone sequenziert werden, ermöglicht die Illumina-Methode durch die enorme Datenmenge eine ausführliche statistische Auswertung der auftretenden Aminosäuren und Sequenzeigenschaften. Der Phagendisplayzyklus musste bei Kombination mit Sanger-DNA-Sequenzierungen mehrmals wiederholt werden um Phagenklone mit einer hohen Affinität für PP anzureichern. Im Gegensatz dazu erwies sich ein einziger Zyklus als ausreichend für das Auffinden PP-bindender Peptide, sofern eine Hochdurchsatzsequenzierung der vollständigen Phagenbibliothek durchgeführt wurde. Die Umwandlung der Illumina-Rohdaten in Peptidsequenzen erfolgte durch ein eigens entwickeltes Computerprogramm in Kooperation mit dem Bioinformatiker Tim Conrad (Freie Universität Berlin).

Für das Screening der unbehandelten PP-Folie konnten über Sanger-Sequenzierung einzelner Phagenklone insgesamt 76 Sequenzen erhalten werden, während die Illumina-Sequenzierung der vollständigen Phagenbibliothek 1,65 Millionen potentiell PP-bindende Peptidsequenzen lieferte. Die Normierung des Illumina-Sequenzpools anhand von Referenzphagenbibliotheken erlaubte darüber hinaus die effektive Eliminierung von Sequenzen, deren Auftreten vorwiegend auf eine effizientere Amplifizierung des entsprechenden Phagenklons in *E. coli* zurückzuführen ist. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil der Illumina-Sequenzierung gegenüber der Sanger-Methode dar. Unter den erhaltenen Peptidsequenzen wurde für die Illumina-Daten aller untersuchten Polypropylenoberflächen eine Anreicherung basischer Aminosäuren bei gleichzeitiger Unterdrückung saurer Aminosäuren beobachtet. Dieser Effekt konnte aufgrund der geringeren Datenmenge in den Sanger-Sequenzpools nur teilweise erkannt werden. Eine generelle Anreicherung hydrophober Aminosäuren, wie sie für die stark hydrophoben Polypropylenoberflächen zu erwarten wäre, zeigte sich dagegen in keinem der Sequenzdatensätze. Die systematische Analyse der Peptidsequenzen ergab Tendenzen hin zu einer geringen Hydrophobie, einer guten Wasserlöslichkeit, einer positiven Nettoladung und voluminösen Aminosäureseitenketten.

Zur Evaluation der Haftungseigenschaften wurde eine Auswahl vielversprechender Peptide, sowohl aus dem Sanger- als auch Illumina-Sequenzpool, als Polyethylenglykol-Konjugate dargestellt und bzgl. der Adsorption auf unbehandeltem Polypropylen über eine fluoreszenzbasierte Analysemethode untersucht. Mit beiden Sequenziermethoden war es möglich, Peptide mit einer hohen Affinität für Polypropylen zu generieren. Als gemeinsame Eigenschaften weisen diese Peptide positive Nettoladungen und voluminöse aliphatische Seitengruppen auf. Die Peptide DYHDSLPTLRK und GNNPLHVHDKR, welche über beide Sequenziermethoden erhalten wurden, zeigten eine hohe Affinität für Polypropylen und eine gute Beschichtungsstabilität gegenüber intensiven Waschschritten. Für die untersuchten Peptidsequenzen des normierten Datensatzes, welche ausschließlich durch Illumina-Sequenzierung zugänglich waren, wurde ebenfalls eine starke Adsorption auf der Polypropylenoberfläche beobachtet. Eines dieser Peptide, mit der Sequenz LYARDVSRYPWHV, zeichnet sich darüber hinaus durch eine hohe Beschichtungsstabilität bei basischem pH-Wert aus. Die Peptide, welche vorrangig oder ausschließlich über Sanger-Sequenzierung erhalten wurden, adsorbieren dagegen kaum auf Polypropylen.

Der separate Austausch der Aminosäuren in der 12-mer-Peptidsequenz LYARDVSRYPWHV durch Serin, zeigte die besondere Bedeutung der basischen Aminosäure Arginin für die Adsorption der Peptidsequenz auf Polypropylen. Die hohe Affinität Arginin-haltiger Sequenzen gegenüber Polypropylen ist nicht allein durch die Basizität zu erklären, da ein

Austausch mit Lysin zum Verlust der Bindungskraft führt. Weiterhin wurde für das Peptid LYARDVSRVYWHV in einem fluoreszenzbasierten Assay unter Annahme einer Monoschicht und eines statistischen Knäuels eine Bedeckung der PP-Oberfläche von 85% berechnet.

Über XPS-Messungen auf den verschiedenen Polypropylenoberflächen wurde neben Kohlenstoff ein geringer Anteil Sauerstoff nachgewiesen. Winkelabhängige XPS-Messungen wiesen zudem auf die Präsenz von C-O- und C=O-Spezies sowie von sp^2 -hybridisiertem Kohlenstoff in den obersten Schichten der Polypropylenoberfläche hin. Die Ergebnisse legen einen Bindungsmechanismus über Salzbrücken zwischen der positiv geladenen Guanidinogruppe des Arginins und der Oberfläche nahe. Darüber hinaus trägt auch die Gesamtheit der hydrophoben Wechselwirkungen zur Bindung bei, wohingegen die Substitution einzelner hydrophober Aminosäuren keinen Verlust der Bindungskraft bewirkt. Phagendisplay bietet hierbei den Vorteil der Erkennung der realen Oberfläche des Substrats, welche lokal auf wenigen Nanometern stattfindet und alle Facetten, einschließlich Verunreinigungen und Oberflächendefekte berücksichtigt.

Zur Quantifizierung der Bindungskraft wurde Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie auf Polypropylenfolien durchgeführt. Gemessene Adhäsionskräfte der Peptid-funktionalisierten kolloidalen Sonden von bis zu 30 nN für die Peptidsequenz LYARDVSRVYWHV resultierten in einer Adhäsionsarbeit von $0,8 \text{ mJ m}^{-2}$. Die Untersuchung einer möglichen Anwendung dieser Polypropylen-bindenden Peptidsequenz als wasserbasierter Haftvermittler erfolgte in Zugversuchen. Nach der Peptidbeschichtung wurden in Kombination mit einem kommerziellen Klebstoff signifikant höhere Haftfestigkeiten auf Polypropylen im Vergleich zur unbeschichteten Oberfläche erreicht. Im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen Primer erreicht das Peptid etwa 50% der Haftfestigkeit des Primers. Der bedeutende Vorteil des Peptids ist die Beschichtung ausgehend von einem vollständig wasserbasierten System, während technische Primer in toxischen organischen Lösungsmitteln wie Heptan auf die Oberfläche aufgetragen werden. Sowohl die Bindungskräfte als auch der haftverbessernde Effekt des Peptids LYARDVSRVYWHV ist sequenzabhängig. Einzelmutationen sowie gescrambelte Peptidvarianten dieser Sequenz zeigten geringere Bindungskräfte, schlechtere Beschichtungseigenschaften und haben keinen Effekt auf die Haftfestigkeit. Dies unterstreicht die Bedeutung der Sequenz und den Erfolg des Phagendisplay-Screenings.

5. Ausblick

Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Kombination aus Phagendisplay und Illumina-Sequenzierung werden Tausende potentiell bindende Peptidsequenzen für die untersuchte Materialoberfläche generiert. Dies verschiebt den limitierenden Faktor der Phagendisplay-Methode von der Sequenzierung zur Synthese und Bindungvalidierung der erhaltenen Peptide. Im nächsten Schritt sollte die Methode daher weiterentwickelt werden, um die separate Synthese und Untersuchung einzelner Peptide zu vermeiden. Eine Möglichkeit dies zu realisieren, ist die parallele Synthese der identifizierten Phagenpeptide, beispielsweise durch die SPOT-Technologie.^[148] Dabei können hunderte Peptide auf einem Trägermaterial auf wenigen Quadratzentimetern aufgebracht werden. Anschließend kann die Adhäsionskraftmessung der Peptide direkt auf dem Trägermaterial mithilfe einer Kolloidsonden-basierten mikroskopischen Methode erfolgen.

Die auf diese Weise weiterentwickelte Methode lässt sich darüber hinaus auf beliebige Materialoberflächen ausweiten. Hierbei müsste lediglich eine Anpassung des Biopanning-Protokolls an die jeweiligen Substrateigenschaften erfolgen, wohingegen die Sequenzierung und Datenauswertung der selektierten Phagenbibliotheken auf identischem Wege stattfinden kann. Interessante Materialien sind beispielsweise weitere Polyolefine, insbesondere Polyethylen, und Fluoropolymere. Diese Kunststoffe mit vielseitigen Anwendungen weisen, wie Polypropylen, niedrige Oberflächenenergien auf und stellen daher problematische Substrate für herkömmliche Klebstoffe dar. Darüber hinaus ist der beschriebene Ansatz auf Metalle, Halbleitermaterialien oder Nanopartikel, aber auch biologische Oberflächen wie Zellgewebe, anwendbar. Für viele Vertreter dieser Materialien sind bereits Peptidbinder durch Phagendisplay oder ähnliche Methoden bekannt, jedoch würde die Hochdurchsatz-Sequenzierung eine deutlich bessere Analyse der Phagenbibliotheken erlauben und bietet daher das Potential bisher unbekannte, stärkere oder selektivere Binder zu identifizieren. Gleichzeitig ist es sinnvoll den Einfluss der Amplifizierungseffekte weiter zu minimieren. Der in dieser Arbeit vorgestellte Normierungsansatz korrigiert diesen zwar weitestgehend in den Sequenzdaten, jedoch ist dazu jeweils eine zusätzliche Illumina-Sequenzierung der Referenzbibliothek nötig. Zukünftige Phagendisplayexperimente sollten daher zum Beispiel mithilfe der Emulsions-Amplifizierung durchgeführt werden, welche die Konkurrenz zwischen langsam- und schnell-wachsenden Klonen verringert, sodass Amplifizierungstendenzen bereits während des Phagendisplays vermieden werden können. Das langfristige Ziel ist die Entwicklung biokompatibler, umweltfreundlicher und nachhaltiger Klebstoffe auf Peptidbasis, deren Anwendungen sich vom Kleben moderner Kunststoffoberflächen bis zum Verschließen von Operationswunden erstrecken können.

6. Experimenteller Teil

6.1 Materialien

6.1.1 Phagendisplay

Die M13 Phagenbibliothek (Lot 14) sowie der *E. coli* Wirtsstamm (*F'* *proA+B+lacIqΔ(lacZ)**M15* *zzf: Tn10(TetR)/fhuA2 glnVΔ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*) wurden von New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Der DNA-Primer -96gIII (5' CCCTCATAGTTAGCGTAACG 3') zur Sanger-Sequenzanalyse wurde in HPLC-Qualität von Biomers.net (Ulm, Deutschland) erworben. Die Extraktion der Phagen-DNA erfolgte mittels eines QIAprep Spin M13 Kit (50) der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande). Sequenzanalysen über die Sanger-Methode erfolgten durch die Firma StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland) und Illumina-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 23. Erwartete und beobachtete Häufigkeiten der insertierten Aminosäuren der initialen Phagenbibliothek (Charge 14, lot# 0351501) sowie der einmal amplifizierten Phagenbibliothek.

Amino-säure	Codon	Erwartete Häufigkeit	Beobachtete Häufigkeit (Initiale Bibliothek)*	Beobachtete Häufigkeit (Initiale Bibliothek)**	Beobachtete Häufigkeit (Amplifizierte Bibliothek)**
Arg	CGK, AGG	9,4%	5,4%	5,2%	5,4%
Leu	CTK, TTG	9,4%	8,5%	7,8%	7,6%
Ser	TCK, AGT	9,4%	11,0%	11,4%	11,5%
Ala	GCK	6,2%	6,6%	7,2%	7,3%
Gly	GGK	6,2%	5,8%	6,4%	6,4%
Pro	CCK	6,2%	7,2%	7,9%	8,1%
Thr	ACK	6,2%	7,6%	7,6%	7,7%
Gln	CAG, TAG	6,2%	4,0%	3,9%	4,3%
Val	GTK	6,2%	6,2%	6,0%	6,0%
Asn	AAT	3,1%	5,0%	4,9%	5,0%
Asp	GAT	3,1%	4,9%	4,9%	4,8%
Cys	TGT	3,1%	1,4%	0,9%	0,6%
Glu	GAG	3,1%	3,1%	3,0%	2,8%
His	CAT	3,1%	4,3%	4,5%	4,6%
Ile	ATT	3,1%	3,6%	3,4%	3,3%
Lys	AAG	3,1%	2,5%	2,3%	2,4%
Met	ATG	3,1%	3,1%	3,2%	3,1%
Phe	TTT	3,1%	3,3%	3,3%	3,2%
Trp	TGG	3,1%	2,2%	2,3%	2,4%
Tyr	TAT	3,1%	4,0%	3,9%	3,8%

*Analyse durch Hersteller über Ion-Torrent-Sequenzierung; **eigene Analyse über Illumina Sequenzierung der initialen und amplifizierten Phagenbibliothek.

Weitere Reagenzien:

Agarose (≥ 99%)	Servan (Heidelberg)
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (Xgal, ≥ 99%)	Sigma-Aldrich (Seelze)
Cyclohexan (≥ 99,9%)	VWR Chemicals (Dresden)
N,N-Dimethylformamid (DMF) (≥ 99,99%)	Biosolve (Dieuze, Frankreich)
Ethanol (≥ 99,9%)	VWR Chemicals (Dresden)
Glycin (≥ 99%)	Acros (Geel, Belgien)
Hefeextrakt	Fisher BioReagents (Schwerte)
Isopropanol (≥ 99,9%)	VWR Chemicals (Dresden)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG, ≥ 99%)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-hexahydrat (MgCl ₂ ·H ₂ O, ≥ 99%)	Roth (Karlsruhe)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) (≥ 99%)	Acros (Geel, Belgien)
Natriumazid (≥ 99%)	Sigma-Aldrich (Seelze)
Natriumchlorid (ultrarein)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Polyethylenglykol (PEG8000)	Acros (Geel, Belgien)
Polypropylen (isotkt., M _w = 250.000 g/mol, M _n = 67.000 g/mol)	Sigma-Aldrich (Seelze)
PP-Folie (Protec-104)	KWH Plast Schur Flexibles Ltd, (Jakobstad, Finnland)
Tetracyclin (≥ 98%)	Sigma-Aldrich (Seelze)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (≥ 99,8%)	Fisher BioReagents (Schwerte)
Trypsin-Lösung (0,25% w/v in BPS w/ Ca ²⁺)	Biochrom AG (Berlin)
Trypton (enzymatischer Verdau aus Casein)	Fluka (Seelze)
Tween-20 (≥ 95%)	Fisher BioReagents (Schwerte)
Wasser (deionisiert)	Millipore Reinstwasseranlage (Milli-Q®, Merck, Darmstadt)

6.1.2 Probenvorbereitung für Illumina-Sequenzierung

Die Phagen-DNA wurde mit Hilfe eines QIAGEN QIAprepSpin M13 Kit extrahiert. Die PCR-Primer wurden von Biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) und das Taq PCR Kit von New England BioLabs Inc. (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Die PCR-Produkte wurden mit einem Gel Loading Dye (6x, violett) von New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) angefärbt, in ein Elektrophorese-Gel (Agarose Standard, Roth, Karlsruhe) in TAE-Puffer (Roth, Karlsruhe) unter Zusatz von SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, USA) überführt und mittels eines GeneJET Gel Extraction Kit von Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, USA) aufgereinigt.

6.1.3 Peptid- und Konjugatsynthese

Alle N- α -Fmoc-geschützten L-Aminosäuren (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH) sowie alle weiteren Reagenzien für die Peptidsynthese (*N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP, 99,9+%, für die Peptidsynthese), Dimethylformamid (DMF, für die Peptidsynthese), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), (2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat) (HCTU), Hydroxyiminocyanessigsäureethylester (Oxyma), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphoniumhexa-fluorophosphat (PyBOP), Dichlormethan (DCM, für die Peptidsynthese) wurden von IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland) bezogen. Vor der Synthese wurde NMP filtriert und DCM über CaH₂ getrocknet und destilliert. Alle weiteren Chemikalien wurden ohne zusätzliche Aufreinigung verwendet. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, für die Peptidsynthese), Piperidin (für die Peptidsynthese), Trifluoressigsäure (TFA, für die Peptidsynthese), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (MALDI MS Matrix), *N*-Methylmorpholin (NMM, 99%) und Pyridin (99%) wurden von Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, USA) bezogen. Triethylsilan (TES, 98+%) wurde von Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) und 5(6)-Carboxyfluorescein (FAM, 97+%, Konstitutionsisomere), Essigsäureanhydrid (Ac₂O, 99%) sowie α -Cyano-4-hydroxymtsäure (99%, MALDI MS Matrix) von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) erhalten. Das TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) wurde von Rapp Polymere (Tübingen, Deutschland) und das Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) von IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, Deutschland) bezogen. Für die NMR-Spektroskopie wurde TFA-d mit einer Reinheit von 99,9% in Ampullen von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) erhalten.

6.1.4 Fluoreszenzassays und Zugversuche

Die Ammoniumhydroxidlösung (28 – 30%, reinst) für den letzten Waschschriff der PP-Folien in Fluoreszenzassays wurde von Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

Für die Zugversuche wurden die Cyanoacrylatklebstoffe LOCTITE® 496 sowie LOCTITE® 460 und der Primer LOCTITE® SF 770 der Firma Henkel (Deutschland) eingesetzt.

6.2 Lösungen und Puffer

Phagendisplay:

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g (85 mmol) NaCl in 1 L Reinstwasser lösen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
Agarose-Top	1 g (5 mmol) $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 7 g (23 mmol) Agarose zu 1 L LB-Medium geben, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
LB-Agar	15 g Agar-Agar zu 1 L LB-Medium geben, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
TBS-Puffer	6 g (50 mmol) Tris und 8,7 g (150 mmol) NaCl in 1 L Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen*, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
TBST-Puffer	TBS-Puffer mit 0,5% (w/v) Tween-20 versetzen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
TBS/ NaN_3	TBS-Puffer mit 0,02% (w/v) NaN_3 versetzen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
Tris/HCl	12,1 g (0,1 mol) Tris in 100 mL Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 9,1 einstellen*, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
Glycin/HCl	1,5 g (20 mmol) Glycin in 100 mL Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 2,2 einstellen*, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
PEG/NaCl	20 g (25 mmol) PEG8000 und 14,6 g (250 mmol) NaCl in 100 mL Reinstwasser lösen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.
IPTG/Xgal	1,25 g (5 mmol) IPTG und 1 g (2,5 mmol) Xgal in 25 mL DMF lösen und bei -20 °C lagern.
Tetracyclin	1 g (2,25 mmol) Tetracyclin in 50 mL Ethanol lösen und bei -20 °C lagern.
SB-Medium	10 g (48 mmol) MOPS, 20 g Hefeextrakt und 30 g Trypton in 1 L Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen*, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

Fluoreszenzbasierte Assays/Zugversuche:

Citratpuffer (pH 5,0)	9,8 g Zitronensäure (50 mmol) in 1 L Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 5,0 einstellen* und bei Raumtemperatur lagern.
Tris-Puffer (pH 9,0)	6 g (50 mmol) Tris in 1 L Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 9,0 einstellen* und bei Raumtemperatur lagern.
TBS-Puffer (pH 7,0)	6 g (50 mmol) Tris und 8,7 g (150 mmol) NaCl in 1 L Reinstwasser lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen* und bei Raumtemperatur lagern.

*Die pH-Werte wurden über eine pH-Elektrode bestimmt und mit HCl- bzw. NaOH-Lösung eingestellt.

6.3 Messgeräte

¹H-NMR: Die Aufnahme von ¹H-Kernspinresonanzspektren (¹H-NMR) erfolgte bei Raumtemperatur an einem AV 500 Spektrometer der Firma Bruker (Billerica [MA], USA) mit 500 MHz in TFA-d (Isotopenreinheit 99,5%).

MALDI-TOF-MS: MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) wurde an einem Gerät der Serie Autoflex III smartbeam der Firma Bruker (Billerica [MA], USA) durchgeführt. Auf dem Probenhalter wurden 2 µL der Peptide bzw. Peptid-Konjugate gelöst in Kaliumphosphatpuffer (17 mM, pH 6,5) mit 1 µL der Matrixlösung (10 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder 7 mg/mL α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in Wasser-Acetonitril (1:1, v/v) mit 0,1% TFA) vermischt und an Luft getrocknet. Die Messungen wurden im linear-positiven Modus durchgeführt.

Präparative HPLC: Die präparative Aufreinigung von Peptiden erfolgte an einem Shimadzu-System (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) mit einem CMB-20A-Controller, einem DGU-14A-Online-Entgaser, einer LC-20AP-Pumpe, einem SIL-20AHT-Autosampler, einem FRC-10A-Fraktionssammler und einem dualen SFD-10Avp UV/Vis-Detektor (Monitoring bei 210 nm). Die Trennung erfolgte durch eine SynergiTM Fusion-RP-Säure (80 Å, 4 µm, 250 x 21,2 mm) der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) mit vorgeschalteter SecurityGuardTM PREP-Kartusche (Fusion-RP, 15 x 21,2 mm, Phenomenex®) bei einer Flussrate von 22,0 mL/min und einer Mischung aus A (99,9% Wasser; 0,1% Ameisensäure) und B (99,9% Acetonitril; 0,1% Ameisensäure) bei 40°C. Für die Aufreinigung der Peptide wurde ein linearer Gradient von 3-30% B in A über 30 min gewählt.

Analytische UPLC: Analytische Messungen erfolgten an einem ACQUITY-UPLC® H-Class CM Core-System der Firma Waters (Eschborn, Deutschland) ausgerüstet mit einem ACQUITY-UPLC® Photodiodenarray-Detektor (190-800 nm) und einem ACQUITY-UPLC® QDa-Massendetektor. Die Trennung erfolgte an den einer ACQUITY-UPLC® BEH C18-Säule (110 Å, 1,7 µm, 50 x 2,1 mm) und einer ACQUITY-UPLC® BEH C18- VanGuardTM-Vorsäule (110 Å, 1,7 µm, 5 x 2,1 mm) in einem Lösungsmittelgemisch aus A (99,9% Wasser; 0,1% Ameisensäure) und B (99,9% Acetonitril; 0,1% Ameisensäure) unter Verwendung von linearen Gradienten über 4 min und einer Flussrate von 0,5 mL/min.

Fast protein liquid chromatography (FPLC): Peptid-PEG-Konjugate wurden über präparative FPLC mit einem Gerät der Serie ÄKTaprime plus der Firma GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) nach vorheriger Filtration (Nylonfilter; 0,45 µm) über drei in Reihe geschaltete

Sephadex® HiTrap-Säulen bei einer Flussrate von 5,0 mL/min aufgereinigt. Als Laufmittel wurde Reinstwasser verwendet.

Fluoreszenz-Assays: Die Fluoreszenz der Peptid-Konjugate auf PP-Folien wurde mittels eines Microarray-Scanners der Firma Databis (Pforzheim, Deutschland) gemessen und anschließend über die Software ImageJ ausgewertet. Die Messungen wurden unter Verwendung eines grünen Lasers und einem Auflösungsfokus von 50 µm und 60 µm durchgeführt. Für quantitative Messungen in Lösung wurden ein Gerät der Serie Synergy Mx Multi-Mode Reader der Firma BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland) verwendet.

PCR: Die Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der Phagen-Insertregion wurde an einem Biometra TGradient (Jena, Deutschland) durchgeführt.

DNA-Sequenzierung: Illumina-Sequenzierung der gesamten Phagenbibliotheken wurde über die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) an Illumina-Geräten der Serie Illumina HiSeq 2500 bzw. HiSeq 4000 durchgeführt. Einzelne Phagenklone wurden von der Firma Starseq GmbH (Mainz, Germany) mit der Sanger-Methode sequenziert.

XPS: XPS-Messungen wurden unter Verwendung eines K-Alpha+ Röntgenphotoelektronenspektrometers (Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, USA) durchgeführt. Alle Proben wurden mit einer mikrofokussierten, monochromatisierten Al-K-α-Röntgenquelle (1486,68 eV; 400 µm Spotgröße) analysiert. Um einen lokalen Ladungsaufbau während der Messung zu vermeiden, wurde bei allen Messungen das Ladungskompensationssystem K-Alpha+ eingesetzt. Die Daten wurden mit der Advantage-Software (Thermo Fisher Scientific) analysiert.

Kontaktwinkel: Die Messungen wurden an einem Drop Shape Analyzer DSA25B der Firma Krüss (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde ein Tropfen Wasser bzw. Diiodmethan (3,5 µL) auf den beschichteten Objektträger getropft. Der Kontaktwinkel wurde mit Hilfe der ADVANCE Software von Krüss bestimmt, welche die resultierende Oberflächenenergie nach der OWRK-Methode^[95] berechnet.

Kolloidsonden-Rasterraftmikroskopie: Die AFM-Adhäsionscharakterisierung wurde an einem MFP-3D Bio (Asylum Research, Oxford Instruments Company, Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. PP-Folien wurden in der geschlossenen Flüssigkeitszelle mit einem selbst hergestellten Einsatz fixiert und mit TBS-Puffer hydratisiert gehalten. Für Adhäsionsmessungen wurden zwei Cantilever (CSC 38, Mikromasch Europe, Wetzlar, Deutschland) mit thermisch rauschkalibrierten Federkonstanten von 115 pN/nm bzw.

328 pN/nm mit Goldkolloid-Sonden (goldbeschichtete Polystyrolpartikel, Durchmesser 16 μm , Microparticles GmbH, Berlin) verwendet. Kraft-Abstands-Messungen wurden mit einer festen Geschwindigkeit von 2 $\mu\text{m/s}$ durchgeführt, während die Kontaktzeiten auf der Oberfläche systematisch zwischen 0 s und 60 s und die Anpresskraft zwischen 2 nN und 50 nN variiert wurden.

Zugversuche: Die Zugversuche wurden in einer LUMIFrac Zentrifuge der Firma LUM (Berlin, Deutschland) mit linearer Beschleunigung von 5N/s durchgeführt. Abrissereignisse werden automatisch und positionscodiert vom Detektionsmodul erkannt und mit der dazugehörigen Software SEPView der Firma LUM ausgewertet. Für die Messungen wurden Kupferstempel verwendet (Gesamtmasse Prüfkörper + Einschraubadapter V2A beträgt 37,08 g). Der Prüfstempel wurde mit 7 μL Klebstoff (LOCTITE® 496) an der entsprechenden Probenoberfläche befestigt und 24 h vor Beginn der Zugversuche bei Raumtemperatur ausgehärtet.

6.4 Methoden

6.4.1 Molekularbiologische Methoden

Herstellung von LB/IPTG/Xgal-Platten: 1 L LB-Agar wurden in der Mikrowelle geschmolzen und auf unter 70 °C abkühlen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mL IPTG/Xgal-Lösung. Das Gemisch wurde auf Petrischalen gegossen, abkühlen gelassen und im Dunklen bei ca. 4 °C gelagert.

Herstellung von *E.-coli*-Platten: 1 L LB-Agar wurde in der Mikrowelle geschmolzen und auf unter 70 °C abkühlen gelassen. Zu 25 mL dieser Lösung wurden 25 μL Tetracyclin-Lösung gegeben, das Gemisch auf eine Petrischale gegossen und abkühlen gelassen. Das ausgehärtete Gel wurde mit *E. coli* (ER2738) geimpft, über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert.

6.4.1.1 Vorbereitung der PP-Folien

Technische PP-Folie:

Für Phagendisplay wurde eine Polypropylen-Folie mit dem Namen Protec-104 vom Hersteller KWH Plast Schur Flexibles Ltd (Jakobstad, Finnland) verwendet. Die Folie weist eine Dicke von 50 μm auf und wurde auf einer Seite Corona-behandelt. Direkt vor Beginn des Biopannings wurde die Folie jeweils eine Minute in Cyclohexan, Ethanol, Wasser und Isopropanol gewaschen. Um den Kontakt der Phagen mit jeweils nur einer Seite der Folie zu erlauben,

wurden 50 mL Falcon-Tubes in der Mitte einmal geschnitten, invertiert und ein etwa 10 cm² großes Stück der Folie zwischen Deckel und Tube straff eingespannt.

Isotaktische PP-Folie:

Die PP-Folie wurde durch Pressen von PP-Pellets (isotaktisch, $M_w = 250.000$ g/mol, $M_n = 67.000$ g/mol) in einer Polymerpresse bei 170 °C unter Druck (1 Minute 1 Tonne, 2 Minuten 2 Tonnen) und anschließender Abkühlung (5 Minuten) hergestellt. Direkt vor Beginn des Biopannings wurde die Folie jeweils eine Minute in Cyclohexan, Ethanol, Wasser und Isopropanol gewaschen.

6.4.1.2 Biopanning

Protokoll 1 (Industrielle PP-Folie):

Biopanning wurde in Falcon-Tubes durchgeführt, sodass jeweils nur eine Seite der Folie in Kontakt mit den Phagen stand (Oberfläche ~6 cm²). Die Folie wurde 5 Minuten mit TBST-Puffer (0,5% Tween-20) gewaschen und 5 Minuten mit 10 µL der Phagenlösung (E8110S, New England Biolabs) in 1 mL TBST-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Phagenlösung entfernt und die Folie 1 Minute in TBST-Puffer unter Schwenken gewaschen. Im Folgenden wurden weitere Waschschrte durchgeführt: **(1)** 1x 5 Minuten 1 mL Gly/HCl Puffer (pH 2.2) und 1 mL TBST zur Neutralisation, **(2)** 6x (Runde 1)/8x (Runde 2)/10x (Runde 3) 2 Minuten 1 mL Gly/HCl Puffer und 1 mL TBST zur Neutralisation der Oberfläche, **(3)** 1 mL TBS Puffer. Nach drei Waschschrten wurde die PP-Folie jeweils in ein frisches Falcon-Tube überführt. Die gebundenen Phagen wurden anschließend durch proteolytischen Verdau in einer Trypsinlösung eluiert. Nach 30 Minuten wurde der Trypsin-Verdau durch Zugabe von 6,8 ml SB-Medium gestoppt.

Protokoll 2 (Selbst hergestellte isotaktische PP-Folie):

Biopanning an der PP-Folie (Oberfläche ~0,5 cm²) wurde in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Die Folie wurde 5 Minuten mit 1 mL TBST Puffer (0,5% Tween-20) gewaschen und 5 Minuten mit 10 µL der Phagenlösung (E8110S, New England Biolabs) in 1 mL TBST Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Phagenlösung entfernt und die Folie 1 Minute in TBST Puffer unter Schwenken gewaschen. Im Folgenden wurden weitere Waschschrte durchgeführt: **(1)** 5x 1 Minute 1 mL TBST, **(2)** 1 mL TBS Puffer. Nach drei Waschschrten wurde die PP-Folie jeweils in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die gebundenen Phagen wurden anschließend

durch proteolytischen Verdau in einer Trypsinlösung eluiert. Nach 30 Minuten wurde der Trypsin-Verdau durch Zugabe von 6,8 mL SB-Medium gestoppt.

6.4.1.3 Amplifizierung

Für die Amplifizierung erfolgte zunächst die Inkubation einer *E. coli*-Kultur in 32 mL LB-Medium in einem sterilen Erlenmeyerkolben bei 220 U/min bei 37 °C bis die mid-log Phase ($OD_{600} \approx 0,5$) erreicht wurde. Anschließend wurden zur Amplifizierung der eluierten Phagen ca. 8 mL Phagen-Lösung und 25 µL Tetracyclin zu der *E. coli*-Kultur gegeben. Das Gemisch wurde für 4,5 h bei 37 °C und 220 U/min inkubiert. Nun erfolgte die Abtrennung von *E. coli*-Zellen mittels Zentrifugation in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) bei 4 °C und 4000 U/min für 20 Minuten und anschließendem Überführen der Lösung in ein neues Zentrifugenröhrchen. Danach wurden die Phagen durch Zugabe von 6,6 mL PEG/NaCl-Lösung über Nacht bei 4 °C gefällt. Das Gemisch wurde bei 4 °C und 4000 U/min für 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Phagen in 1 mL TBS aufgenommen. Die Lösung wurde in ein steriles Schnappdeckel-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 12.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt, um restliche *E. coli*-Zellen quantitativ zu entfernen. Anschließend wurden die Phagen durch Zugabe von 170 µL PEG/NaCl-Lösung 30 Minuten auf Eis gefällt und bei 4 °C und 12.000 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bibliothek in 100 µL TBS + 0,02% NaN_3 resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die so erhaltene Phagenbibliothek wurde für nachfolgende Panning-Runden verwendet.

6.4.1.4 Titern

Zur Quantifizierung eluierter bzw. amplifizierter Phagen erfolgte zunächst die Inkubation einer *E. coli*-Kultur in 2-3 mL LB-Medium in einem Falcon-Tube bei 220 U/min und 37 °C, bis die mid-log Phase ($OD_{600} \approx 0,5$) erreicht wurde. Anschließend wurden 200 µL dieser Kultur mit Phagenverdünnungsreihen ($1:10^1$ - $1:10^2$ für eluierte Phagen; $1:10^8$ - $1:10^{11}$ für amplifizierte Phagen) infiziert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die infizierten Kulturen wurden in Zentrifugenröhrchen mit ca. 45 °C warmem Agarose-Top überführt und vermischt. Danach wurde die Kultur auf eine vorgewärmte (≈ 37 °C) LB/IPTG/Xgal-Platte gegeben und vorsichtig gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden für ca. 5 Minuten abkühlen gelassen, invertiert und über Nacht im Dunklen bei 37 °C inkubiert. Phagen wurden auf Platten mit ca. 100 Kolonien gezählt.

6.4.1.5 Sanger-Sequenzierung einzelner Phagenklone

Einzelne infizierte *E. coli*-Kolonien wurden mittels einer Pipette von Titerplatten gepickt und wie beschrieben amplifiziert. Die Phagen-DNA wurde mittels eines QIAGEN QIAprepSpin M13 Kit (50) extrahiert. Anschließend Sequenzierungen erfolgten durch die Firma StarSEQ GmbH (Mainz). Die erhaltene Sequenz entspricht dem 3'-5'-komplementären Folgestrang der Phagen-DNA-Sequenz und ist in einem Ausschnitt in Abbildung 45 dargestellt.

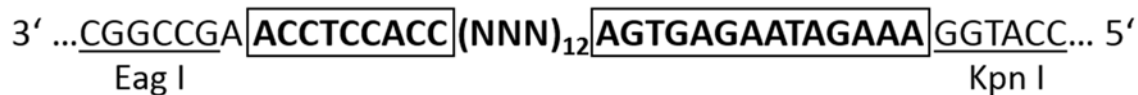


Abbildung 45. Ein Ausschnitt der Folgestrang-DNA-Sequenz, welche durch die Sequenzierung des modifizierten M13-Bakteriophagen erhalten wird.

Zunächst wurden die Kpn I und Eag I Schnittstellen lokalisiert, zwischen denen der Einbau der randomisierten 36 bp Sequenz sowie eines Tri-Glycin-Abstandhalters erfolgte. Anschließend erfolgte die Identifizierung des eingebauten Tri-Glycin-Abstandhalters sowie der natürlichen Sequenz AGAGTGAGAATAGAAA. Das Zwischenfragment entspricht nun der randomisierten 36-mer-DNA. Diese Sequenz muss vor der Übersetzung ins entsprechende Peptid in den Leitstrang überführt werden.

6.4.2 Vorbereitung der Illumina-Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Illumina-Sequenzierung wurde zunächst die Phagen-DNA der amplifizierten Phagenlösung nach der ersten bzw. zweiten Runde Biopanning extrahiert. Die DNA-Extraktion wurde, wie für einzelne Klone, mit einem QIAGEN QIAprepSpin M13 Kit durchgeführt. Für die naive Referenzbibliothek wurden 20 µL Phagenlösung für die DNA-Extraktion verwendet. Im nächsten Schritt wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, um die 36 bp Insertregion der Phagen zu vervielfältigen. Ein Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurde anhand von Standardkriterien ausgewählt (Vorwärts: 5'-TTGTCGTCTTTCCAGACGTT-3'; Rückwärts: 5'-GCAAGCTGATAAACCGATACA-3'). Eine Mastermix-Lösung mit allen notwendigen Komponenten der PCR wurde unter Eiskühlung hergestellt und anschließend auf die 50 µL PCR-Tubes verteilt. Die folgenden Komponenten sind enthalten: 1 µL Phagen-DNA-Template (75-135 ng), 0,25 µL jedes Primers (0,5 µM), 0,25 µL Taq-Polymerase (1,25 units), 1 µL dNTP-Lösung (200 µM), 5 µL Standard-taq-Puffer und 42,25 µL Reinstwasser. Die Taq-Polymerase wurde als letztes zugegeben und danach durch leichtes Schwenken des Gefäßes vorsichtig verteilt. Vor Überführung der PCR-Tubes in den Thermocycler wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen am Boden der PCR-Tubes

befinden. Nach 25 PCR-Zyklen (30 s bei 95 °C, 45 s bei 50,6 °C, 30 s bei 68 °C) wurden die 242 bp PCR-Produkte über Gelelektrophorese aufgereinigt. Hierfür wurde ein 2%iges Agarose-Gel (0,6 g Agarose in 30 mL TAE-Puffer) durch Vermischen, 15 Minuten Inkubation und anschließendes kurzes Erhitzen in der Mikrowelle hergestellt. Das heiße Gel wurde in das Elektrophoresegerät überführt und mit 1 µL Sybr Gold zur Anfärbung der DNA versetzt. Nach 30 Minuten wurden die Lösungen der PCR-Produkte mit Gel Loading Dye (6x, violett) im Verhältnis 6:1 vermischt und in die Taschen des erhärteten Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde 35 min bei 100 V durchgeführt. Unter einer UV-Lampe wurden die 242 bp PCR-Produkte lokalisiert, mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und mit einem GeneJET Gel Extraction Kit von Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgereinigt. Die erhaltenen Amplikon-Bibliotheken wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) an Geräten der Serie Illumina HiSeq 2500 bzw. HiSeq 4000 sequenziert. Dabei wurden mindestens 10 Mio. 125 bp bzw. 150 bp Reads durch Paired-End-Reading ausgeführt. Die von GATC durchgeführte Prozedur beinhaltet Adapter-Ligation und Amplifizierung der Amplikon-Bibliotheken.

6.4.3 Sequenzanalyse der Illumina-Daten

Die Rohdaten der Illumina-Sequenzierung wurden im FastQ-Format von GATC (Konstanz, Deutschland) bereitgestellt. Die allgemeine Vorgehensweise der Datenauswertung wurde bereits in Kapitel 3.4.1 ausführlich erläutert.

Da die Illumina-Sequenzierung im Paired-End-Lesemodus durchgeführt wurde, wurden zwei Dateien (1 und 2) erhalten, die die entsprechenden Reads für jedes sequenzierte Amplikon enthalten (zum besseren Verständnis siehe Abbildung 17, Kapitel 3.4.1). Jeder Read entspricht demnach einem Phagenklon. Das Computerprogramm^[108], welches in Kooperation mit Dr. Tim Conrad (Freie Universität Berlin) erstellt wurde, führt folgende Schritte zur Datenauswertung aus:

1. Übersetzung eines Reads (in Datei 1) in das reverse Komplement
2. Identifizierung der Abschnitte, die das 36 bp-Insert flankieren

Erklärung: Das randomisierte 36-bp-Insert, welches die 12-mer-Peptidsequenz codiert, wird im Phagen genom von den natürlich vorkommenden Sequenzabschnitten EagI und KpnI sowie der Sequenz ACCTCCACC flankiert (Abbildung 45). Das Programm identifiziert diese flankierenden Sequenzen, welche für alle Phagenklone identisch sind.

3. Suche nach dem überlappenden Sequenzabschnitt von Read in Datei 1 mit dem entsprechenden Read in Datei 2

Erklärung: Zum besseren Verständnis siehe Abbildung 17, Kapitel 3.4.1

4. Zusammenführen beider Reads über den überlappenden Sequenzabschnitt

Bedingungen: Zwei Fehler (nicht übereinstimmende Nukleobasen) sind im flankierenden Bereich zulässig, um nicht zu viele Sequenzen zu verlieren. Sequenzen mit nicht übereinstimmenden Basen in der Insert-Region werden dagegen verworfen, um keine fehlerhaften Peptidsequenzen zu erhalten.

5. Qualitätsfilter

Erklärung: Die resultierenden Sequenzen werden auf der Basis der Qualität (Q-Wert) gefiltert, wobei Sequenzen verworfen werden, wenn mehr als drei Basen einen Q-Wert unter 18 aufweisen. Außerdem werden alle Sequenzen, die andere als NNK-Codons enthielten, verworfen.

6. Übersetzung des zusammengeführten 36 bp-DNA-Reads in 12-mer Peptidsequenz

Erklärung: Die Übersetzung erfolgt anhand des Genetischen Codes, wobei jeweils drei Nukleobasen einer Aminosäure entsprechen.

7. Entfernung der Peptide mit falscher Länge

Erklärung: Ein geringer Teil der Sequenzen wiesen nur 11 Aminosäuren anstelle von 12 Aminosäuren auf und wurden daher entfernt.

Die Normierung der Sequenzhäufigkeit wurde für die Phagenbibliothek PP_{unb} nach einer Panning-Runde anhand der einfach amplifizierten Referenzbibliothek nach Gleichung 5 durchgeführt. Dieser Normierungsschritt ist nur für solche Sequenzen möglich, welche in beiden Sequenzdatensätzen mindestens einmal auftreten. Um die normierte Häufigkeit einer Sequenz zu erhalten wurde das Verhältnis der Kopienzahl dieser Sequenz in der Bibliothek PP_{unb} (PP) zur Kopienzahl dieser Sequenz in der Referenzbibliothek (Ref) multipliziert mit dem Verhältnis der Gesamtsequenzen beider Datensätze (2.826.774 Sequenzen (Ref) und 9.892.881 Sequenzen (PP)).

$$\text{Normierte Häufigkeit} = \frac{\text{Kopienzahl(PP)} \cdot \text{Gesamtsequenzen(Ref)}}{\text{Kopienzahl (Ref)} \cdot \text{Gesamtsequenzen(PP)}} \quad \text{Gleichung (5)}$$

6.4.4 Festphasensynthese der Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate

Automatisierte Synthese: Zur Herstellung der Peptide sowie Peptid-PEG-Konjugate im 0,1 mM Maßstab wurde ein ABI 433a Peptidsyntheseroboter der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die einzelnen Kupplungsschritte erfolgten unter Standard-Fmoc-Strategie nach ABI-Fastmoc-Syntheseprotokollen (Einfachkupplung bis zur 10. Aminosäure; Zweifachkupplung ab 11. Aminosäure, keine Acetylierung nicht-reagierter Aminofunktionen). Es wurden jeweils 10 Äquivalente der entsprechenden Aminosäuren verwendet. Für die Aminosäurekupplung wurden HBTU und DIPEA verwendet. Nach finaler Abspaltung von Fmoc wurde das Harz in einen 10 mL-Spritzenreaktor überführt, 10x mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuumschrank getrocknet.

Synthese-Lösungen:

DIPEA: 70 mL (402 mmol) DIPEA gelöst in 130 mL NMP

HBTU: 51,2 g (135 mmol) HBTU gelöst in 300 mL NMP

Piperidin-Lösung: 100% Piperidin

Automatisierte Synthese (Multisynthesizer): Die Peptid-PEG-Konjugate für den Serin-Scan und die Kontrollsequenzen wurden an einem Multisynthesizer MultiPep RSi der Firma Intavis AG (Köln, Deutschland) in 5 mL Spritzenreaktoren hergestellt. Die einzelnen Kupplungsschritte erfolgten unter Standard-Fmoc-Strategie. Für die Fmoc-Abspaltung wurde das Harz 2x5 min lang mit 1,5 mL DMF/Piperidin (4:1) behandelt und mit DMF (6 × 1,7 mL) gewaschen. Die Aminosäurederivate (4 Äq.) wurden voraktiviert mit 3,8 Äq. HCTU, 4 Äq. Oxyma und 10 Äq. NMM in DMF und nach einer Minute zum Harz gegeben. Nach 30 min wurde das Harz mit DMF (3 × 1,7 mL) gewaschen. Um nicht umgesetzte Aminogruppen zu acetylieren, wurden dem Harz 1,2 mL Cappinglösung zugesetzt (Ac₂O/Pyridin/DMF (20:18:62)). Nach 5 min wurde das Harz gewaschen (2 × 1,7 mL). Nach finaler Abspaltung von Fmoc wurde das Harz 10x mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuumschrank getrocknet.

FAM-Kupplung: Die FAM-Kupplungen erfolgten am festen Träger unter Lichtausschluss. Das Harz eines 0,1 mmol-Ansatzes wurde in 2,5 mL einer Reaktionslösung aus FAM (367 mg, 1 mmol, 10 Äq.), Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) (520 mg, 1 mmol, 10 Äq.) und N-Methylmorpholin (NMM) (220 µL, 2 mmol, 20 Äq.) in NMP zweimal mindestens 2 h gekuppelt und anschließend gründlich mit NMP und DCM gewaschen und im Vakuumschrank getrocknet. Im nächsten Schritt erfolgte die Abspaltung vom Harz.

Freisetzung von Peptiden bzw. Peptid-Polymer-Konjugaten: Das getrocknete Harz wurde 1-2 Stunden für Peptide bzw. 3-4 Stunden für Peptid-Polymer-Konjugate in TFA/H₂O/TES (95:2:3, 5-10 mL) geschüttelt. Für schwefelhaltige Peptide bzw. Konjugate wurde TFA/H₂O/EDT/TES (94:2,5:2,5:1, 5-10 mL) zur Abspaltung verwendet. Nach zweimaligen Spülen des Harzes mit je 0,5 mL TFA wurden die vereinigten TFA-Phasen aus tiefgekühltem Et₂O (-20 °C, 50 mL) gefällt, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Lösen des Rückstandes in 1-2 mL TFA und nochmaliges Fällen des Produkts. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x wiederholt. Der Rückstand wurde anschließend im Vakuumtrockenschrank getrocknet, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Es folgte eine Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC für Peptide oder präparative FLPC für Peptid-Polymer-Konjugate. Für Cystein-haltige Peptidsequenzen wurde während der Aufreinigung Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) zugesetzt.

6.4.5 Fluoreszenzbasierte Adsorptions-Elutions-Experimente

Die PP-Folie wurde 30 min mit 1 mL einer Stammlösung (100 µM) der FAM-Peptid-Konjugate inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Folie 1-5x mit Reinstwasser gewaschen, wobei der letzte Waschschrift mit stark verdünnter, wässriger Ammoniumhydroxidlösung (pH 9) durchgeführt wurde. Die Fluoreszenz wurde direkt auf der PP-Folie gemessen und über *ImageJ* Software ausgewertet.

Für die quantitative Bestimmung des adsorbierten FAM-Peptid-Konjugats Pep_{N4}-PEG wurde die PP-Folie mit EtOH gewaschen um das Konjugat zu entfernen. Die erhaltene Lösung wurde mit Reinstwasser soweit verdünnt, dass sich die gemessene Fluoreszenzintensität linear zur Konzentration verhält. Zusätzlich wurde eine Kalibriergerade im linearen Bereich aufgenommen. Eine Stoffmenge von 1,9 nmol des Konjugats Pep_{N4}-PEG wurde für die PP-Folie mit einer Oberfläche von 4 cm² erhalten. Für die Berechnung der Oberflächenbedeckung wurde nur die Peptidsequenz berücksichtigt und die Konformation eines statistischen Knäuels angenommen. Der Hydrationsradius des statistischen Knäuel wurde anhand der Gleichungen (6) und (7) berechnet.^[149] Für R_g/R_h , wurde ein Durchschnittswert von 1,65 angenommen.

$$R_g^2 = 1/6 \cdot N \cdot L^2 \quad \text{(Gleichung 6)}$$

$$R_g/R_h \approx 1,5 - 1,8 \quad \text{(Gleichung 7)}$$

Mit R_g = Gyrationradius, R_h = Hydrationsradius, N = Anzahl der Einheiten und der Länge einer Peptideinheit $L = 0,35 \text{ nm}^{[130]}$ ergibt sich für R_h bei einem 13-mer Peptid einen Wert von $0,31 \text{ nm}$, womit eine Oberflächenbedeckung von $A_{\text{Peptid}} = 0,3 \text{ nm}^2$ berechnet werden kann.

6.4.6 Kolloidsonden-Rasterkraftmikroskopie (Kolloidsonden-AFM)

Die goldbeschichteten Styrolpartikel wurden unter dem Lichtmikroskop mittels Epoxidharz an den Cantilevern befestigt (CSC 38, Mikromasch Europe, Wetzlar, Deutschland). Die Funktionalisierung der Cantilever erfolgte über Tauchbeschichtung in einer Peptidstammlösung (1 mM, 100 Sekunden) und anschließendes Waschen mit Reinstwasser. Für AFM-Messungen wurden die PP-Folien in eine geschlossene Flüssigkeitszelle überführt, und mit Heißkleber fixiert. Die Zelle wurde vollständig mit TBS-Puffer gefüllt. Adhäsionsexperimente wurden mit den Peptid-funktionalisierten Cantilevern durchgeführt. Die Kraftkalibrierung der Cantilever erfolgte durch thermisches Rauschen (Federkonstante)^[150] und durch Drücken gegen eine nicht verformbare Oberfläche (Cantilever-Empfindlichkeit)^[145]. Adhäsionswechselwirkungen wurden durch manuelles Absenken des Cantilevers bis zum Kontakt gemessen. Beginnend mit einer Anpresskraft von 2 nN wurde die Kontaktzeit zwischen 0 s und 60 s (0 s , 1 s , 2 s , 5 s , 10 s , 20 s , 30 s , 60 s) variiert und bei höheren Belastungskräften von bis zu 50 nN wiederholt. Für jede Kombination aus Anpresskraft und Kontaktzeit wurden drei Kurven aufgenommen. Diese Experimente wurden an drei verschiedenen Stellen der unbehandelten PP-Folie für jedes der drei Peptide

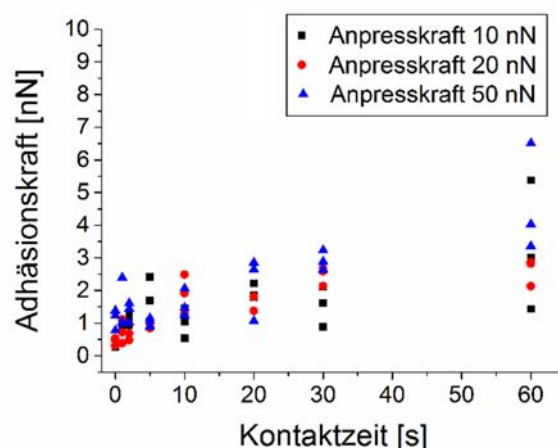


Abbildung 46. Mikroskopische Adhäsionsmessungen einer unbeschichteten Sonde als Referenz. (Bedingungen: Kolloidale Sonden (goldbeschichtet, $\varnothing 16 \mu\text{m}$) am Cantilever. Die AFM-Messungen erfolgten in Flüssigkeitszellen mit TBS-Puffer (pH 7,5). Die Rohdaten wurden unter Berücksichtigung der Federkonstante, der Empfindlichkeit (Inverse Optical Lever Sensitivity, InvOLS) und der Cantilever-Auslenkung in quantitative Kraft-Abstands-Kurven umgewandelt)

wiederholt. Um die Adhäsionskräfte zu extrahieren, wurden die aufgezeichneten Rohdaten durch Berücksichtigung der Federkonstante, der Empfindlichkeit (Inverse Optical Lever Sensitivity, InvOLS) und der Cantilever-Auslenkung in quantitative Kraft-Abstands-Kurven umgewandelt.^[145-146] Aus diesen Kurven wird die Adhäsionskraft (maximale Rückstellkraft) berechnet. Die Adhäsionsarbeit wurde über das JKR-Modell nach Gleichung 2 (Kapitel 3.8) berechnet.

Als Referenz wurden die Adhäsionskräfte einer unbeschichteten kolloidalen Sonde in TBS-Puffer auf einer Stelle der PP-Folie unter identischen Messbedingungen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 für verschiedene Kontaktzeiten s (0 s, 1 s, 2 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 60 s) und verschiedene Anpresskräfte (10 nN, 20 nN, 50 nN) dargestellt.

6.5 Analyse der Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate

6.5.1 Phagendisplay-abgeleitete Peptid-PEG-Konjugate

Pep_{S1}-PEG: Fam-G-DYHDPSLPTLRK-block-PEG

Pep_{S1}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n = 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

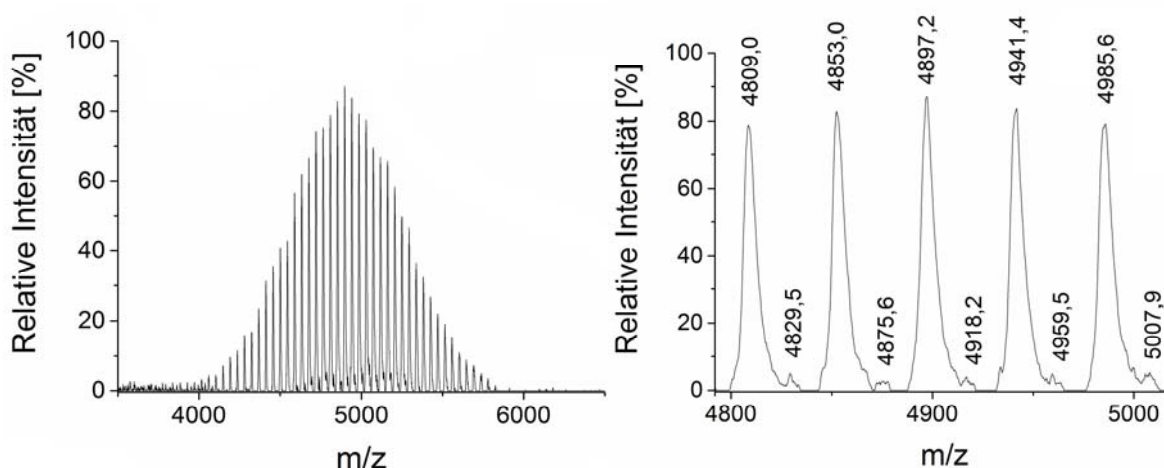


Abbildung 47. MALDI-TOF-MS von Fam-G-DYHDPSLPTLRK-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4896,42 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4897,2 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{S1}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,8 \text{ g/mol}$ zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z 4918,2$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-DYHDPSLPTLRK-block-PEG}_{69}) + \text{Na}]^+ = 4918,31 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von $< 0,2 \text{ g/mol}$ zugeordnet werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 9.01-6.86 (m, 15 H, $15 \times \text{CH}_{\text{Ar,Fam,H,R}}$), 5.71-4.03 (m, 16 H, $12 \times \text{CH}_{\text{D,Y,H,P,S,L,T,R,K}}$, $2 \times \text{CH}_{2,\text{G,S}}$), 3.94-3.79 (m, 276 H, $\text{CH}_{2,\text{PEO}}$), 3.72-3.01 (m, 11 H, $1 \times \text{CH}_T$, $5 \times \text{CH}_{2,\text{H,P,R,K}}$), 2.44-1.29 (m, 35 H, $2 \times \text{CH}_L$, $15 \times \text{CH}_{2,\text{D,Y,P,L,R,K}}$, $1 \times \text{CH}_{3,\text{T}}$), 0.99-0.91 (m, 12 H, $4 \times \text{CH}_{3,\text{L}}$).

Pep_{S2}-PEG: Fam-G-GNNPLHVHDKR-block-PEG

Pep_{S2}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

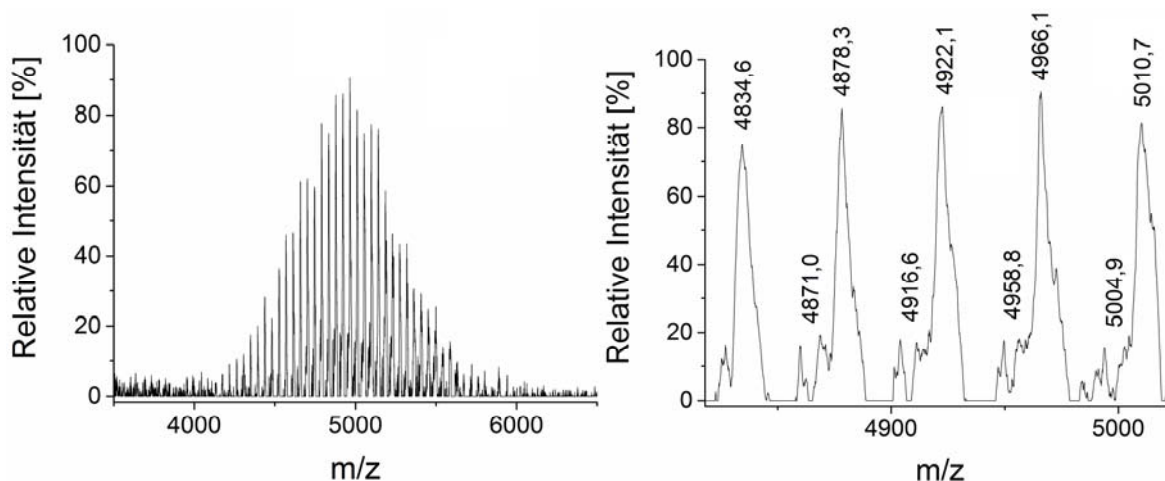


Abbildung 48. MALDI-TOF-MS von Fam-G-GNNPLHVHDKR-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4922,42 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4922,1 Da

Die Masse wurde mit 70 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{S2}-PEG mit einer Abweichung von < 0,4 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z \text{ 4958,8}$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-GNNPLHVHDKR-block-PEG}_{70}) + K]^+ = 4960,51 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von < 1,8 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 9.02-7.29 (m, 15 H, 15xCH_{Ar,Fam,H}), 5.40-4.02 (m, 15 H, 11xCH_{N,P,L,H,V,D,K,R}, 2xCH_{2,G}), 3.94-3.90 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.73-2.98 (m, 16 H, 8xCH_{2,N,P,H,K,R}), 2.39-1.55 (m, 22 H, 2xCH_{L,V}, 10xCH_{2,P,L,D,K,R}), 0.94-0.89 (m, 12 H, 4xCH_{3,L,V}).

Pep_{S3}-PEG: Fam-G-VCSPCGPVPPAK-block-PEG

Pep_{S3}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

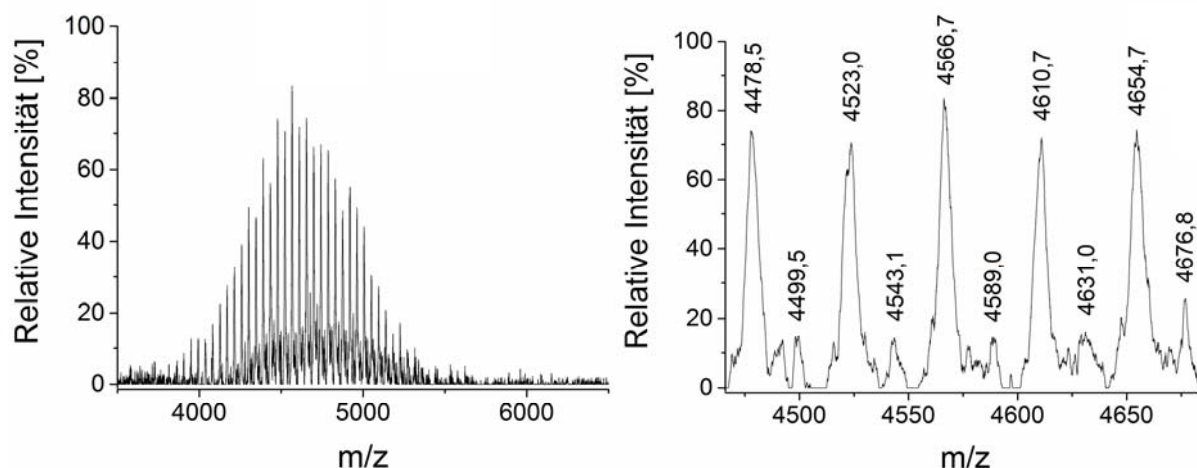


Abbildung 49. MALDI-TOF-MS von Fam-G-VCSPCGPVPPAK-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4565,19 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4566,7 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{S3}-PEG mit einer Abweichung von < 1,6 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z \text{ 4589,0}$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-GNNPLHVHDKR-block-PEG}_{68}) + \text{Na}]^+ = 4587,08 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von < 2,0 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm):

9.03-7.31 (m, 9 H, 9xCH_{Ar,Fam}), 5.49-4.06 (m, 17 H, 11xCH_{V,C,S,P,A,K}, 3xCH_{2,G,S}), 4.00-3.79 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.75-1.30 (m, 41 H, 2xCH_V, 18xCH_{2,C,P,K}, 1xCH_{3,V}), 1.10-1.03 (m, 12 H, 4xCH_{3,V}).

Pep_{S4}-PEG: Fam-G-RFFDSEFDVAFH-block-PEG

Pep_{S4}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

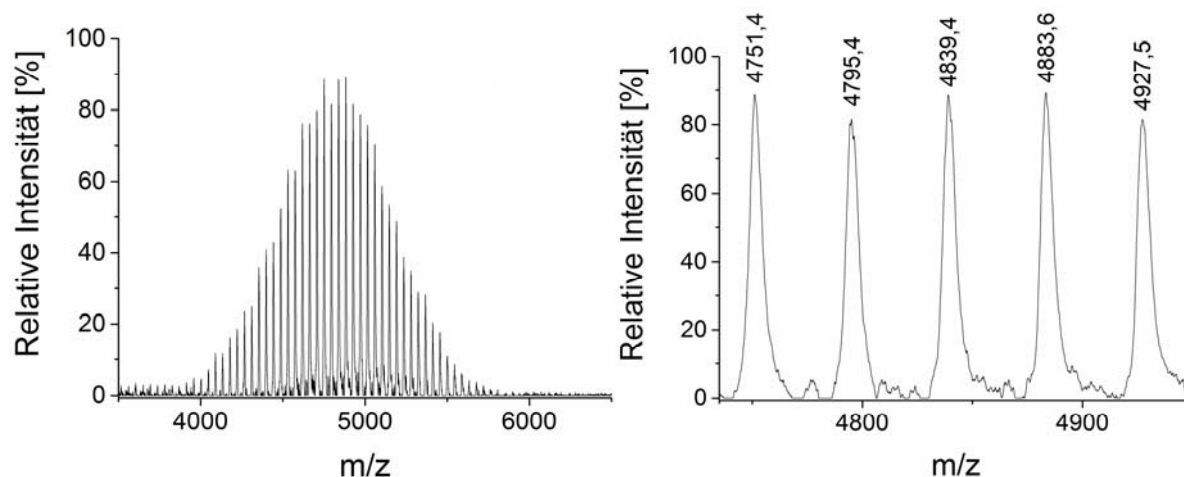


Abbildung 50. MALDI-TOF-MS von Fam-G-RFFDSEFDVAFH-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4839,29 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4839,4 Da

Die Masse wurde mit 66 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{S4}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,2$ g/mol zugeordnet werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, TFA- d , δ in ppm): 9.03-7.17 (m, 31 H, $31 \times \text{CH}_{\text{Ar,Fam,F,H}}$), 5.13-4.05 (m, 16 H, $12 \times \text{CH}_{\text{R,F,D,S,E,V,A,H}}$, $2 \times \text{CH}_{2,\text{G,S}}$), 3.96-3.93 (m, 276 H, $\text{CH}_{2,\text{PEO}}$), 3.82-1.30 (m, 30 H, $1 \times \text{CH}_{\text{V}}$, $13 \times \text{CH}_{2,\text{R,F,D,E,H}}$, $1 \times \text{CH}_{3,\text{A}}$), 1.04-1.01 (m, 6 H, $2 \times \text{CH}_{3,\text{V}}$).

Pep₁₁-PEG: Fam-G-QVNLGERSQQM-block-PEG

Pep₁₁-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

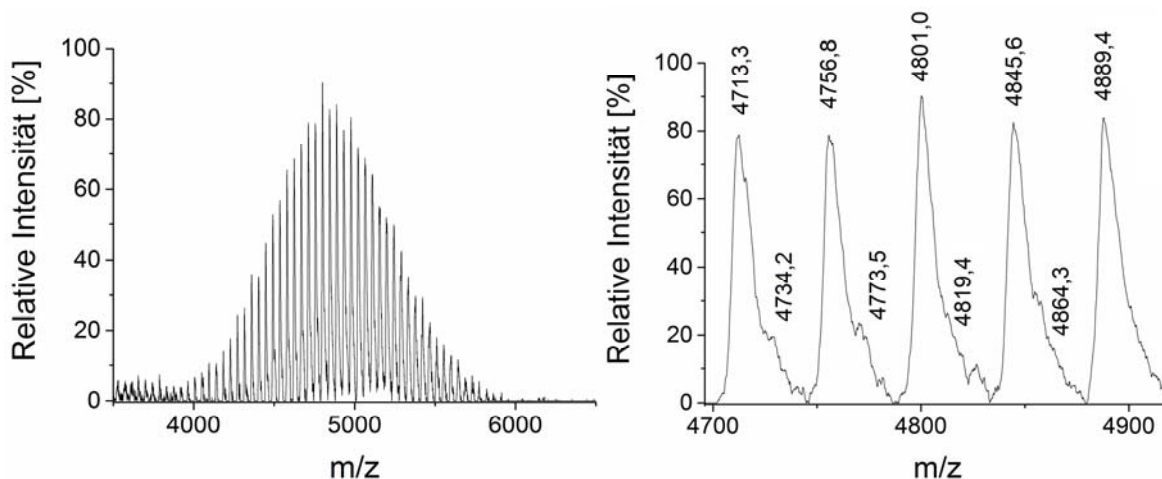


Abbildung 51. MALDI-TOF-MS von Fam-G-QVNLGERSQQM-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4801,30 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4801,0 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep₁₁-PEG mit einer Abweichung von 0,3 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z \text{ 4819,4}$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-QVNLGERSQQM-block-PEG}_{69}) + \text{Na}]^+ = 4823,19 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von $< 3,8 \text{ g/mol}$ zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.96-7.25 (m, 9 H, 9xCH_{Ar,Fam}), 5.20-4.11 (m, 18 H, 10xCH_{Q,V,N,L,E,S,R,M}, 4xCH_{2,G,S}), 4.00-3.86 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.61-2.64 (m, 14 H, 7xCH_{2,Q,N,E,R,M}), 2.40-1.24 (m, 16 H, 2xCH_{V,L}, 7xCH_{2,Q,L,M,R}), 2.11 (s, 3 H, CH_{3,M}), 1.01-0.17 (m, 12 H, 4xCH_{3,L,V}).

Pep₁₂-PEG: Fam-G-TAKYLPMRPGPL-block-PEG

Pep₁₂-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

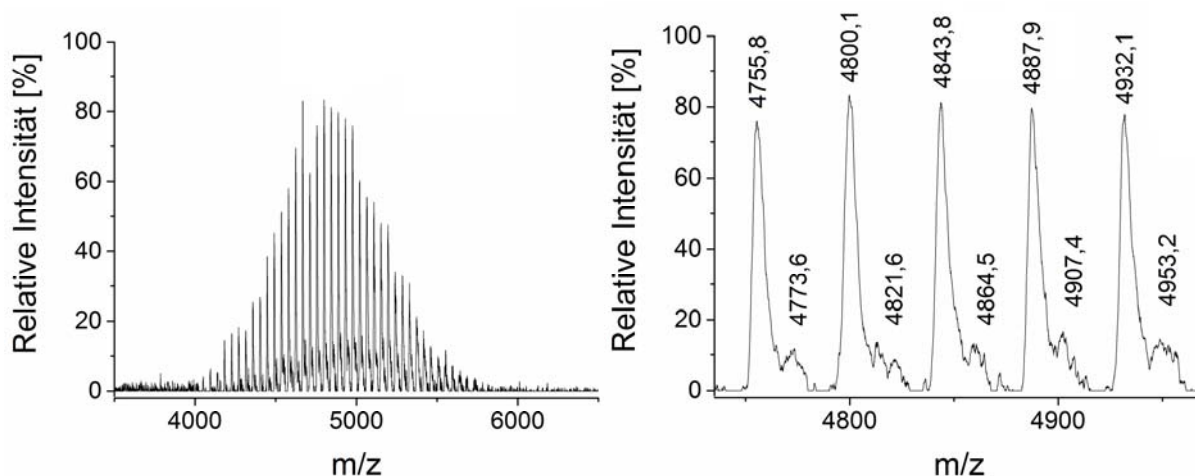


Abbildung 52. MALDI-TOF-MS von Fam-G-TAKYLPMRPGPL-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4842,52 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4843,8 Da

Die Masse wurde mit 70 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep₁₂-PEG mit einer Abweichung von < 1,3 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z$ 4864,5 der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-TAKYLPMRPGPL-block-PEG}_{70}) + \text{Na}]^+ = 4864,41$ Da mit einer Abweichung von < 0,1 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.97-7.23 (m, 9 H, 9xCH_{Ar,Fam}), 7.03-6.79 (m, 4 H, 4xCH_{Ar,Y}), 4.91-4.48 (m, 15 H, 11xCH_{P,L,T,A,K,Y,M,R}, 2xCH_{2,G}), 4.11-3.53 (m, 284 H, CH_{2,PEO,P,R}), 3.27-2.35 (m, 9 H, 4xCH_{2,K,Y,M}, 1xCH_T), 2.18-1.32 (m, 34 H, 2xCH_{3,T,A}, 13xCH_{2,P,L,K,R}, 2xCH_L), 2.11 (s, 3 H, CH_{3,M}), 0.93-0.14 (m, 12 H, 4xCH_{3,L}).

Pep₁₃-PEG: Fam-G-HNDNNTDQTWWW-block-PEG

Pep₁₃-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n = 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

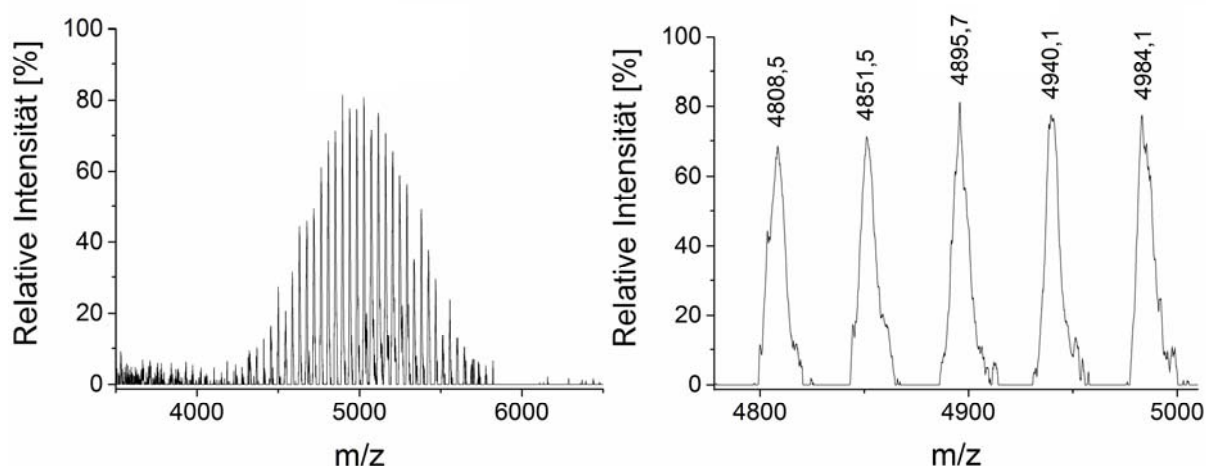


Abbildung 53. MALDI-TOF-MS von Fam-G-HNDNNTDQTWWW-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4895,24 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4895,7 Da

Die Masse wurde mit 65 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep₁₃-PEG mit einer Abweichung von < 0,5 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.96-7.24 (m, 26 H, 26xCH_{Ar,Fam,W,H}), 5.14-4.09 (m, 14 H, 12xCH_{N,W,D,T,H,Q}, 1xCH_{2,G}), 4.01-3.69 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.64-1.24 (m, 28 H, 2xCH_T, 13xCH_{2,N,W,D,H,Q}), 0.69-0.15 (m, 6 H, 2xCH_{3,T}).

Pep₁₄-PEG: Fam-G-WCIRCSNLDASW-block-PEG

Pep₁₄-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

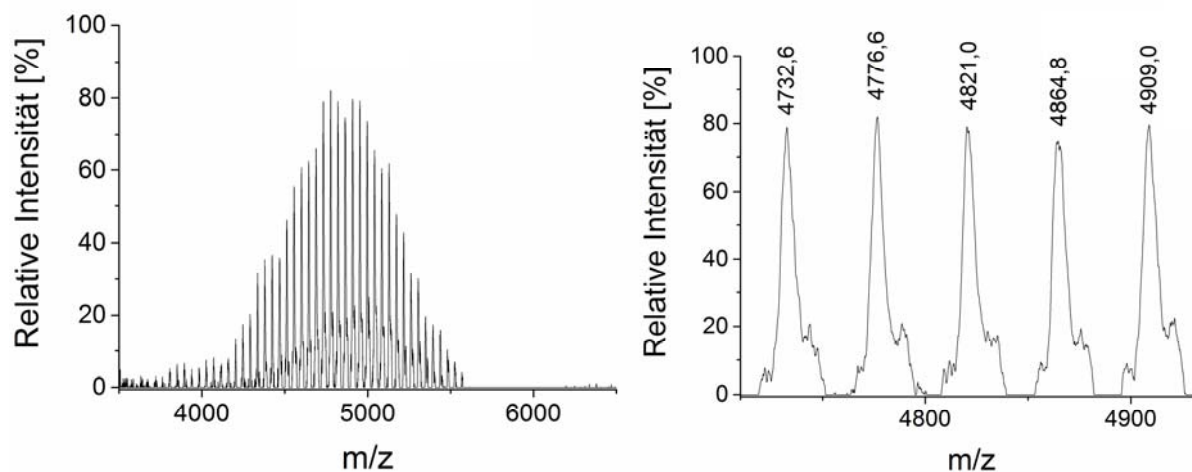


Abbildung 54. MALDI-TOF-MS von Fam-G-WCIRCSNLDASW-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4820,38 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4821,0 Da

Die Masse wurde mit 67 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep₁₄-PEG mit einer Abweichung von < 0,7 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.91-7.16 (m, 19 H, 19xCH_{Ar,Fam,W}), 5.12-3.97 (m, 14 H, 12xCH_{W,C,I,R,S,N,L,D,A}, 1xCH_{2,G}), 3.91-3.76 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.63-1.23 (m, 33 H, 2xCH_{L,I}, 14xCH_{2,W,C,I,R,S,N,L,D}, 1xCH_{3,A}), 0.93-0.14 (m, 12 H, 4xCH_{3,I,L}).

Pep_{N4}-PEG: Fam-G-LYARDVSRWHV-block-PEG

Pep_{N4}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

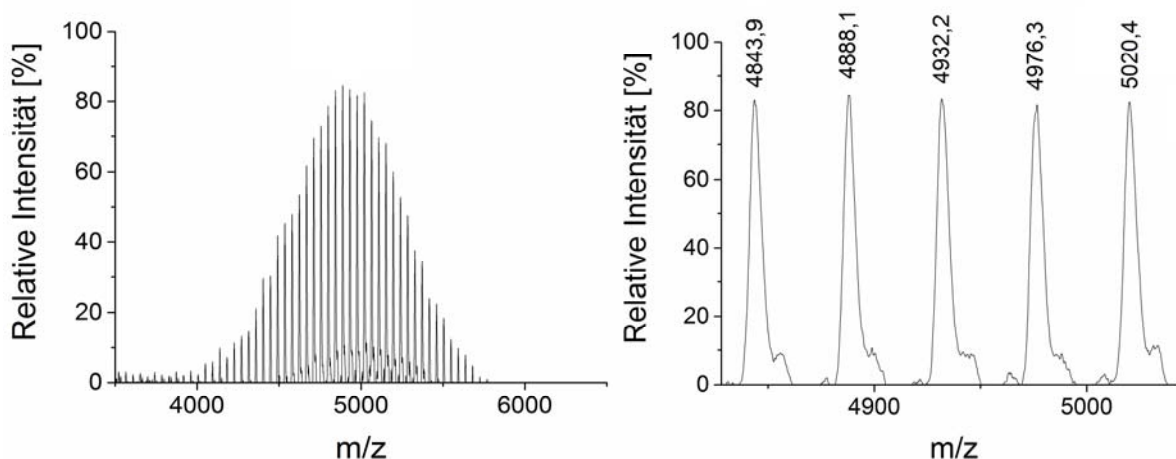


Abbildung 55. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSRWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+$ _{ber.}: 4931,48 Da

$[M + H]^+$ _{gef.}: 4932,2 Da

Die Masse wurde mit 67 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4}-PEG mit einer Abweichung von < 0,8 g/mol bestimmt werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.97-6.82 (m, 24 H, 24xCH_{Ar,Fam,W,H,Y}), 5.09-3.96 (m, 16 H, 12xCH_{L,Y,A,R,D,V,S,W,H}, 2xCH_{2,G,S}), 3.86-3.72 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.62-1.24 (m, 32 H, 3xCH_{L,V}, 13xCH_{2,L,Y,R,D,W,H}, 1xCH_{3,A}), 0.96-0.16 (m, 18 H, 6xCH_{3,L,V}).

Pep_{N3}-PEG: Fam-G-HVSTTDLLGPRR-block-PEG

Pep_{N3}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

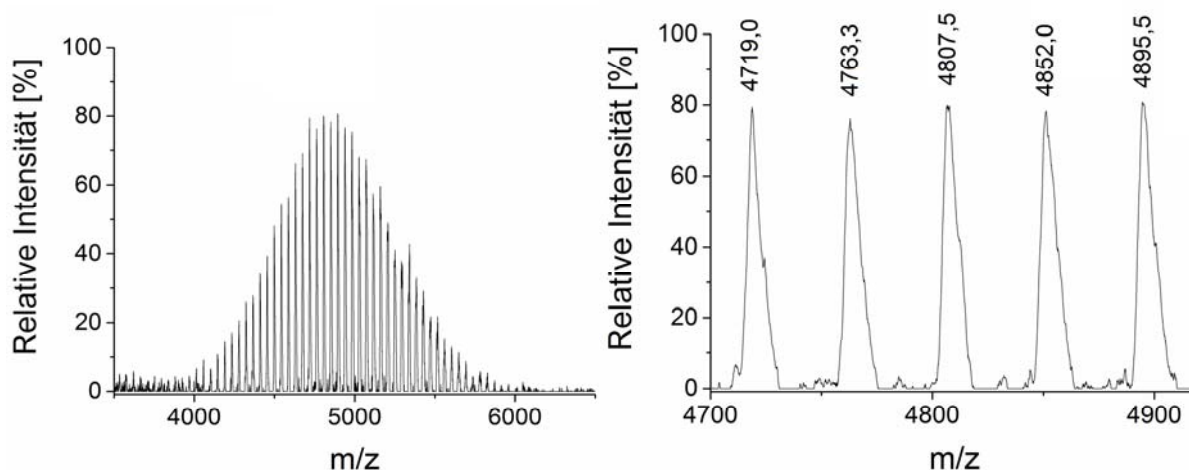


Abbildung 56. MALDI-TOF-MS von Fam-G-HVSTTDLLGPRR-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4806,34 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4807,5 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N3}-PEG mit einer Abweichung von $< 1,2$ g/mol zugeordnet werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.96-7.25 (m, 11 H, $11 \times \text{CH}_{\text{Ar},\text{Fam},\text{H}}$), 5.15-3.99 (m, 17 H, $11 \times \text{CH}_{\text{H},\text{V},\text{S},\text{T},\text{D},\text{L},\text{P},\text{R}}$, $3 \times \text{CH}_{2,\text{G},\text{S}}$), 3.86-3.70 (m, 276 H, $\text{CH}_{2,\text{PEO}}$), 3.60-1.24 (m, 39 H, $5 \times \text{CH}_{\text{L},\text{V},\text{T}}$, $14 \times \text{CH}_{2,\text{H},\text{D},\text{L},\text{P},\text{R}}$, $2 \times \text{CH}_{3,\text{T}}$), 0.96-0.14 (m, 18 H, $6 \times \text{CH}_{3,\text{L},\text{V}}$).

Pep_{N2}-PEG: Fam-G-NFLGAVAKGAIH-block-PEG

Pep_{N2}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

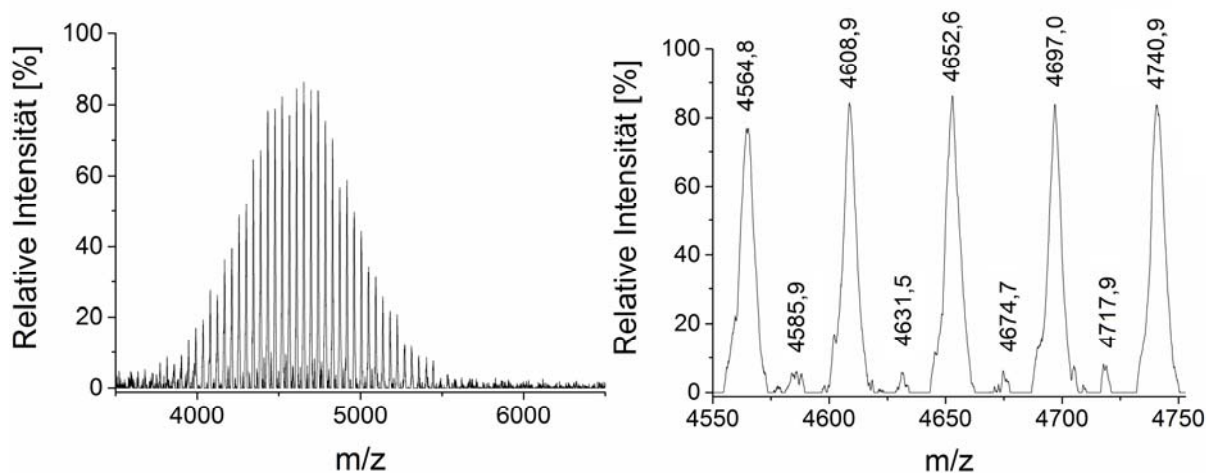


Abbildung 57. MALDI-TOF-MS von Fam-G-NFLGAVAKGAIH-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4652,22 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4652,6 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N2}-PEG mit einer Abweichung von < 0,4 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z \text{ 4674,7}$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-NFLGAVAKGAIH-block-PEG}_{69}) + \text{Na}]^+ = 4674,11 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von < 0,6 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.95-6.76 (m, 16 H, 16xCH_{Ar,Fam,F,H}), 5.18-3.94 (m, 16 H, 10xCH_{N,F,L,A,K,I,H,V}, 3xCH_{2,G}), 3.84-3.74 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.61-2.97 (m, 8 H, 4xCH_{2,N,F,K,H}), 2.30-1.11 (m, 22 H, 3xCH_{L,I,V}, 5xCH_{2,L,K,H}, 3xCH_{3,A}), 0.82-0.13 (m, 18 H, 6xCH_{3,L,I,V}).

Pep_{N1}-PEG: Fam-G-SCTLERCMYRNG-block-PEG

Pep_{N1}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

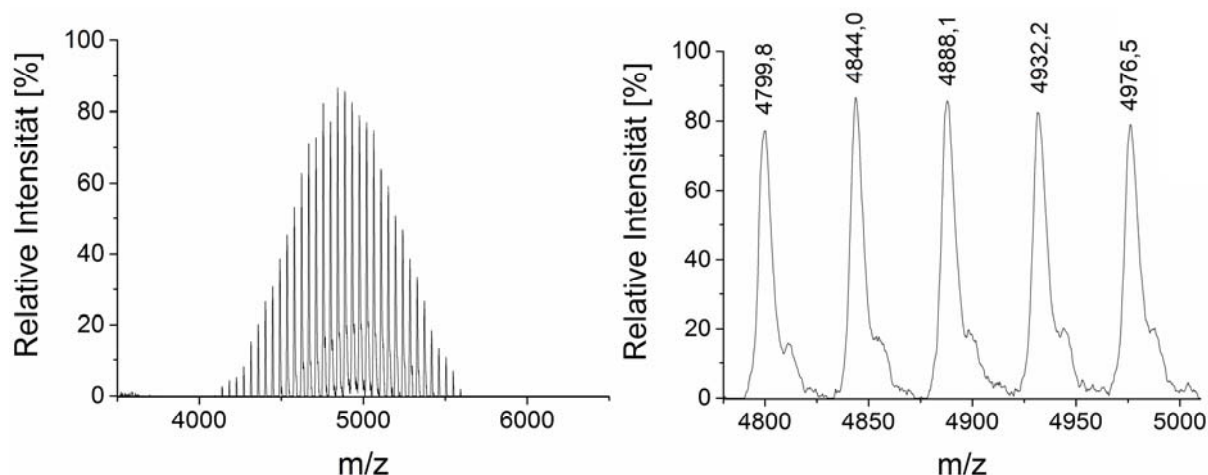


Abbildung 58. MALDI-TOF-MS von Fam-G-SCTLERCMYRNG-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4887,48 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4888,1 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N1}-PEG mit einer Abweichung von < 0,7 g/mol zugeordnet werden.

¹H-NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 8.96-6.83 (m, 13 H, 13xCH_{Ar,Fam,Y}), 5.08-3.95 (m, 17 H, 11xCH_{N,F,L,A,K,I,H,V}, 3xCH_{2,G,S}), 3.92-3.80 (m, 276 H, CH_{2,PEO}), 3.62-1.23 (m, 33 H, 2xCH_{L,T}, 14xCH_{2,C,T,L,E,R,M,Y,N}, 1xCH_{3,T}), 2.07 (s, 3 H, 1xCH_{3,M}), 0.91-0.14 (m, 6 H, 2xCH_{3,L}).

6.5.2 Peptid-PEG-Konjugate für den Serin-Scan

Die Synthese der Peptid-PEG-Konjugate, welche abgeleitet von Pep_{N4}-PEG im Rahmen des Serin-Scans untersucht wurden, erfolgte am Multisynthesizer im 0,01 mM Maßstab nach Protokoll in Kapitel 6.4.4.

Die Charakterisierung erfolgte ausschließlich massenspektrometrisch (MALDI-TOF-MS).

Pep_{N4Ser1}-PEG: Fam-G-SYARDVSRWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser1}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

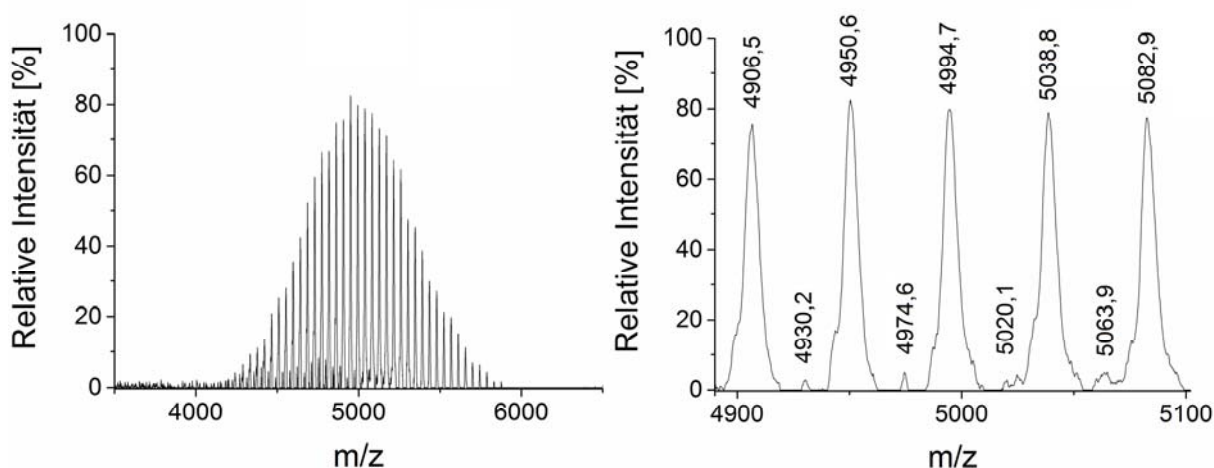


Abbildung 59. MALDI-TOF-MS von Fam-G-SYARDVSRWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4949,45 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4950,6 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser1}-PEG mit einer Abweichung von < 1,2 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z \text{ 4974,6}$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-SYARDVSRWHV-block-PEG}_{68}) + \text{Na}]^+ = 4971,34 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von < 3,3 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser2}-PEG: Fam-G-LSARDVSRWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser2}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

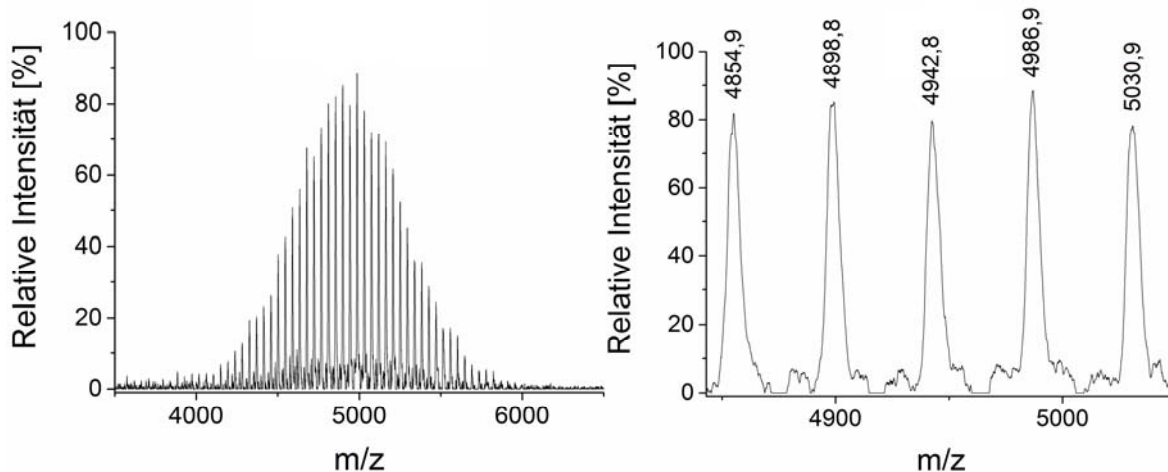


Abbildung 60. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LSARDVSRWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4943,48 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4942,8 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser2}-PEG mit einer Abweichung von < 0,7 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser3}-PEG: Fam-G-LYSRDVSRVWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser3}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

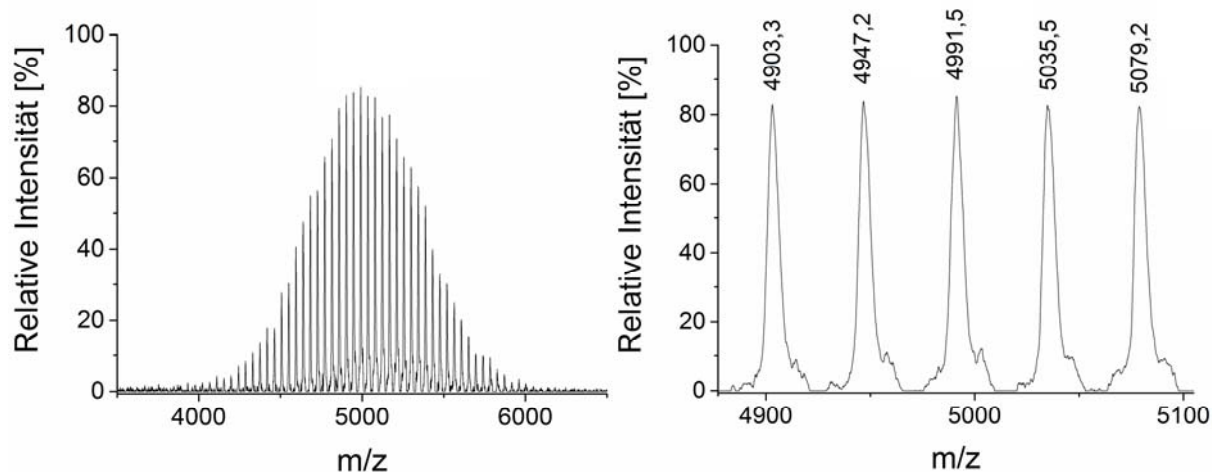


Abbildung 61. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYSRDVSRVWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4991,53 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4991,5 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser3}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,1 \text{ g/mol}$ zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser4}-PEG: Fam-G-LYASDVSRWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser4}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

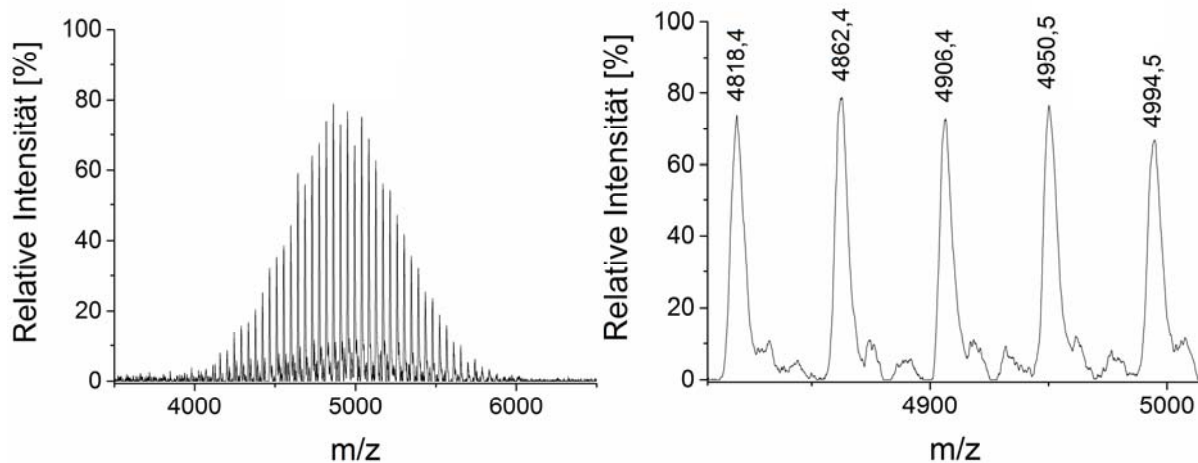


Abbildung 62. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYASDVSRWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4906,42 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4906,4 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser4}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,1$ g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser5}-PEG: Fam-G-LYARSVSRYWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser5}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

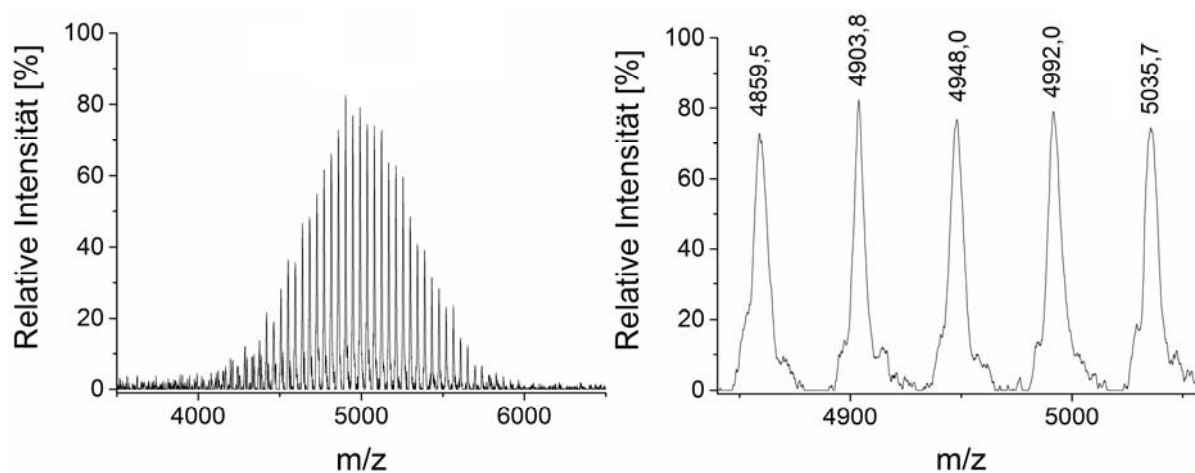


Abbildung 63. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARSVSRYWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

[M + H]⁺_{ber.}: 4947,52 Da

[M + H]⁺_{gef.}: 4948,0 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser5}-PEG mit einer Abweichung von < 0,5 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser6}-PEG: Fam-G-LYARDSSRYWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser6}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

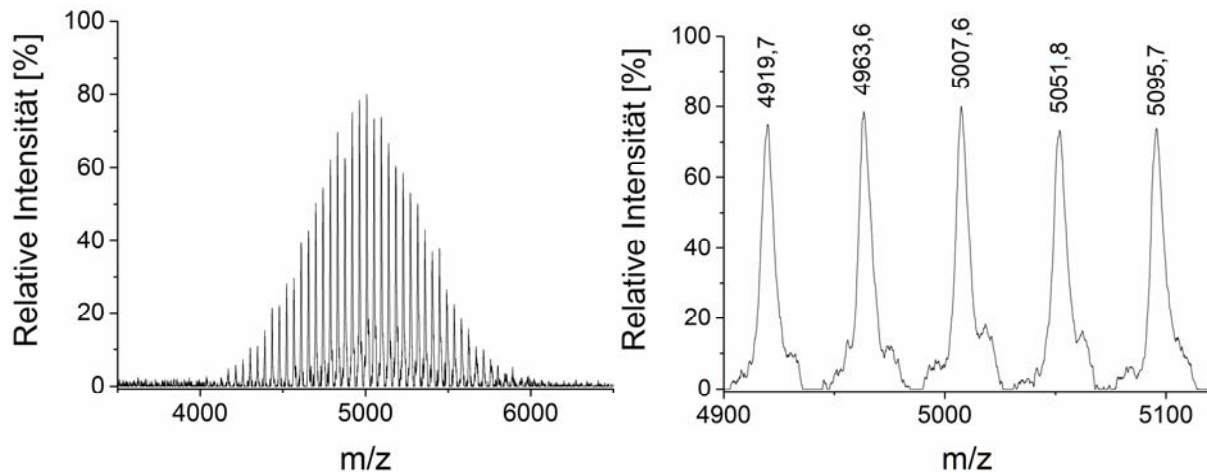


Abbildung 64. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDSSRYWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 5007,52 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 5007,6 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser6}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,1$ g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser8}-PEG: Fam-G-LYARDVSSYWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser8}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

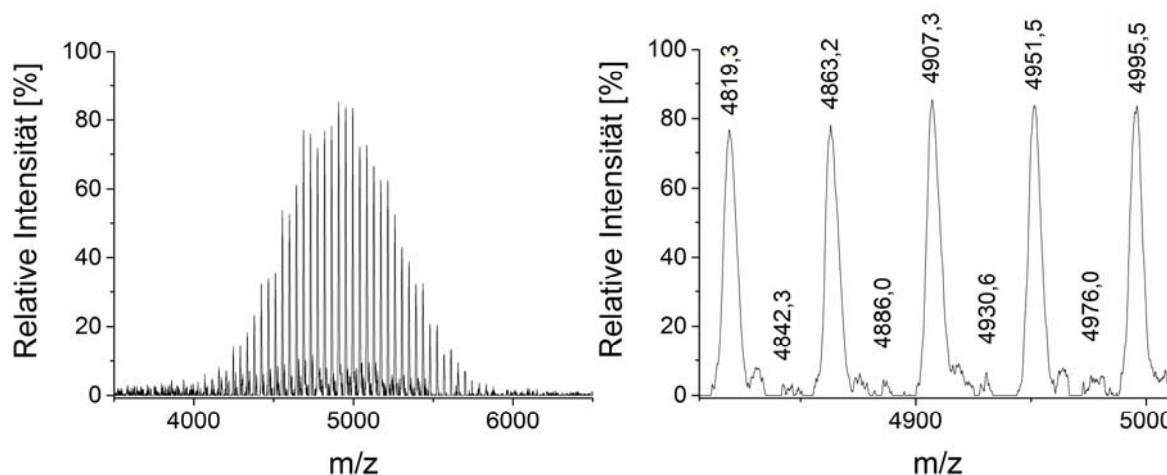


Abbildung 65. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSSYWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4906,42 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4907,3 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser8}-PEG mit einer Abweichung von < 0,9 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z 4930,6$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-LYARDVSSYWHV-block-PEG}_{68}) + \text{Na}]^+ = 4928,31 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von < 2,3 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser9}-PEG: Fam-G-LYARDVSRSWHV-block-PEG

Pep_{N4Ser9}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

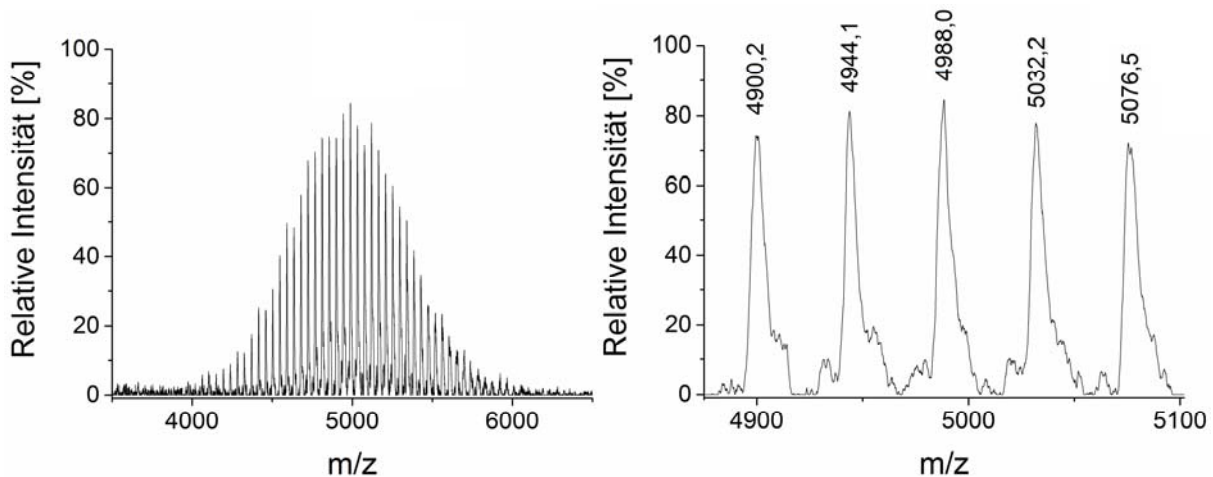


Abbildung 66. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSRSWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4987,53 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4988,0 Da

Die Masse wurde mit 70 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser9}-PEG mit einer Abweichung von < 0,5 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser10}-PEG: Fam-G-LYARDVSRYSHV-block-PEG

Pep_{N4Ser10}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

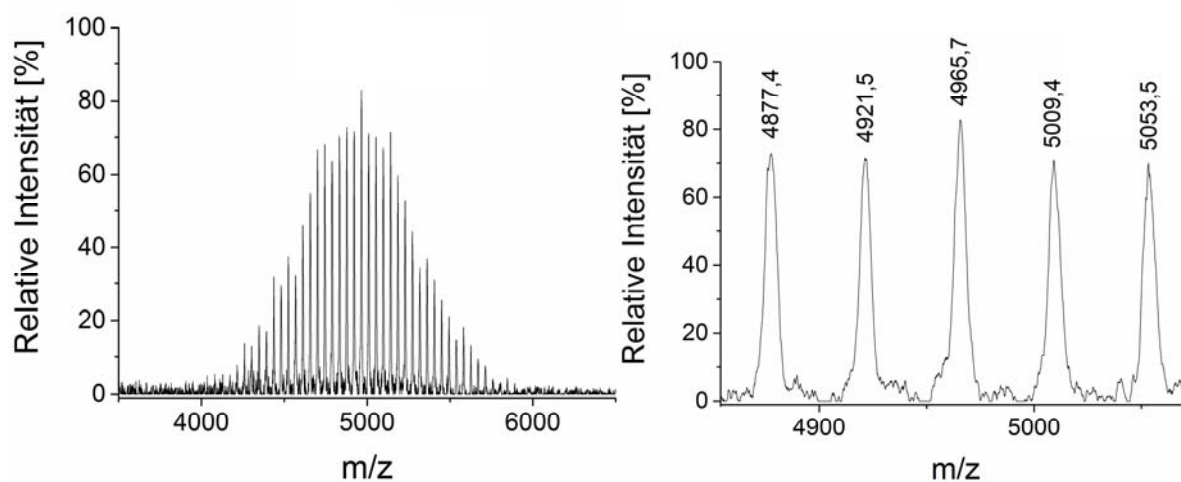


Abbildung 67. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSRYSHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4964,50 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4965,7 Da

Die Masse wurde mit 70 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser10}-PEG mit einer Abweichung von < 1,2 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser11}-PEG: Fam-G-LYARDVSRYSV-block-PEG

Pep_{N4Ser11}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

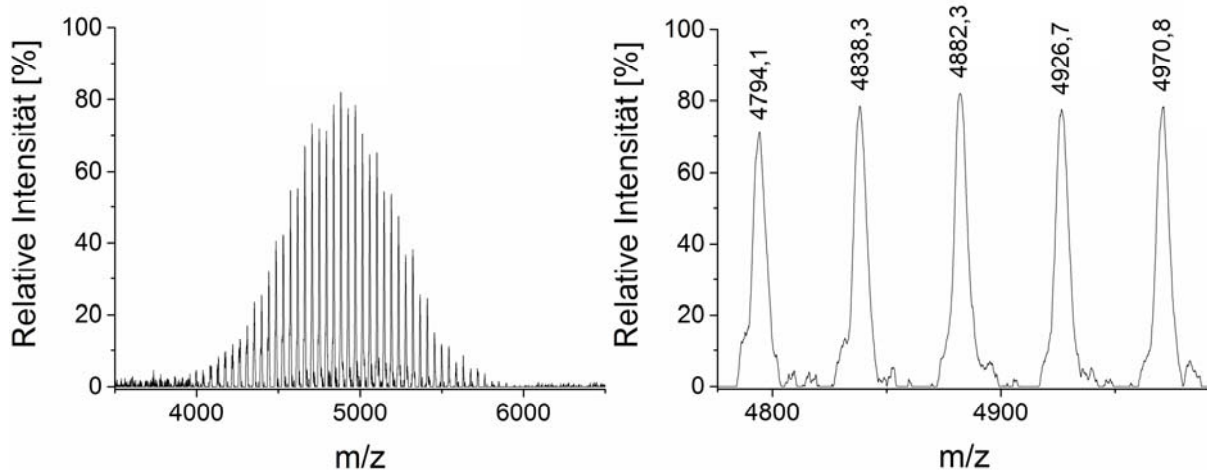


Abbildung 68. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSRYSV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4881,42 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4882,3 Da

Die Masse wurde mit 67 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser11}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,9$ g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Ser12}-PEG: Fam-G-LYARDVSRWHS-block-PEG

Pep_{N4Ser12}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

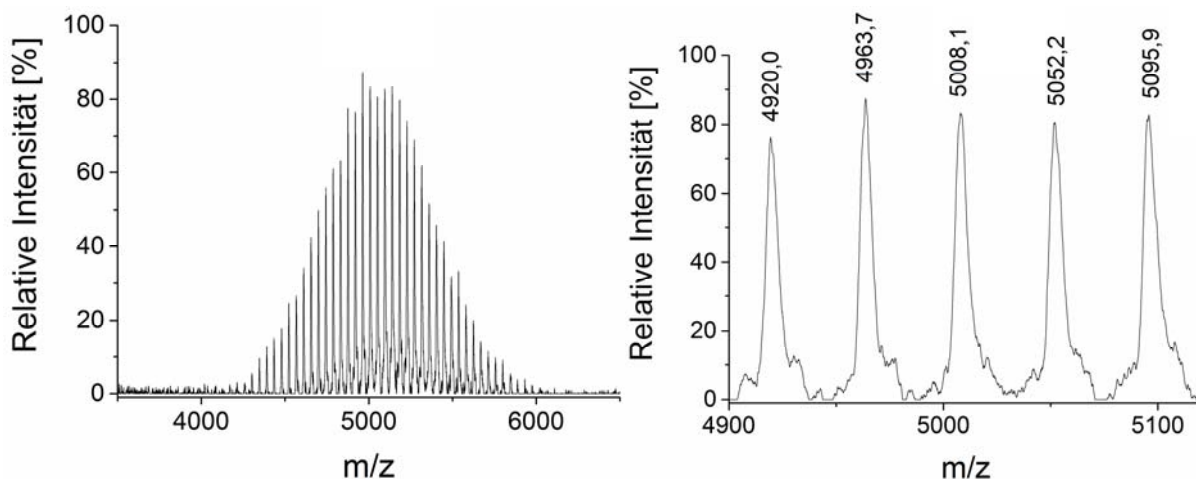


Abbildung 69. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSRWHS-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 5007,52 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 5008,1 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Ser12}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,6$ g/mol zugeordnet werden.

6.5.3 Kontrollsequenzen

Die Synthese der Peptid-PEG-Konjugate, welche abgeleitet von Pep_{N4}-PEG als Kontrollsequenzen untersucht wurden, erfolgte am Multisynthesizer im 0,01 mM Maßstab nach Protokoll in Kapitel 6.4.4.

Die Charakterisierung erfolgte ausschließlich massenspektrometrisch (MALDI-TOF-MS).

Pep_{N4A}-PEG: Fam-G-AYARDASRYWHA-block-PEG

Pep_{N4A}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

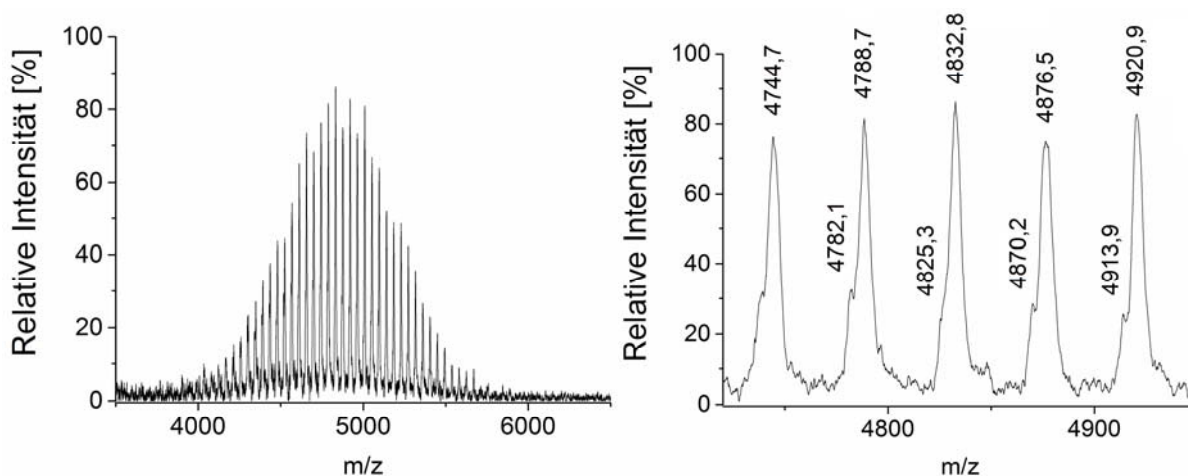


Abbildung 70. MALDI-TOF-MS von Fam-G-AYARDASRYWHA-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4833,29 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4832,8 Da

Die Masse wurde mit 67 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4A}-PEG mit einer Abweichung von < 0,5 g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z 4870,2$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-AYARDASRYWHA-block-PEG}_{67}) + K]^+ = 4871,38 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von < 1,2 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4R4K}-PEG: Fam-G-LYAKDVSRVWHV-block-PEG

Pep_{N4R4K}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; M_n= 3000 g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

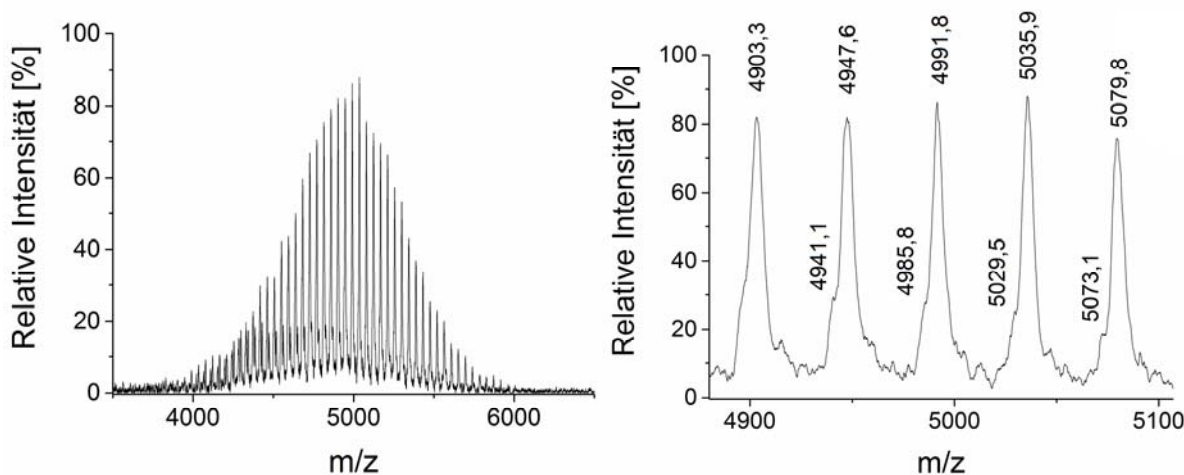


Abbildung 71. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYAKDVSRVWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4991,56 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4991,8 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05 \text{ m/z}$) berechnet. Die Signale können Pep_{N4R4K}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,3 \text{ g/mol}$ zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z 5029,5$ der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-LYAKDVSRVWHV-block-PEG}_{69})+K]^+ = 5029,65 \text{ Da}$ mit einer Abweichung von $< 0,2 \text{ g/mol}$ zugeordnet werden.

Pep_{N4R8K}-PEG: Fam-G-LYARDVSKYWHV-block-PEG

Pep_{N4R8K}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

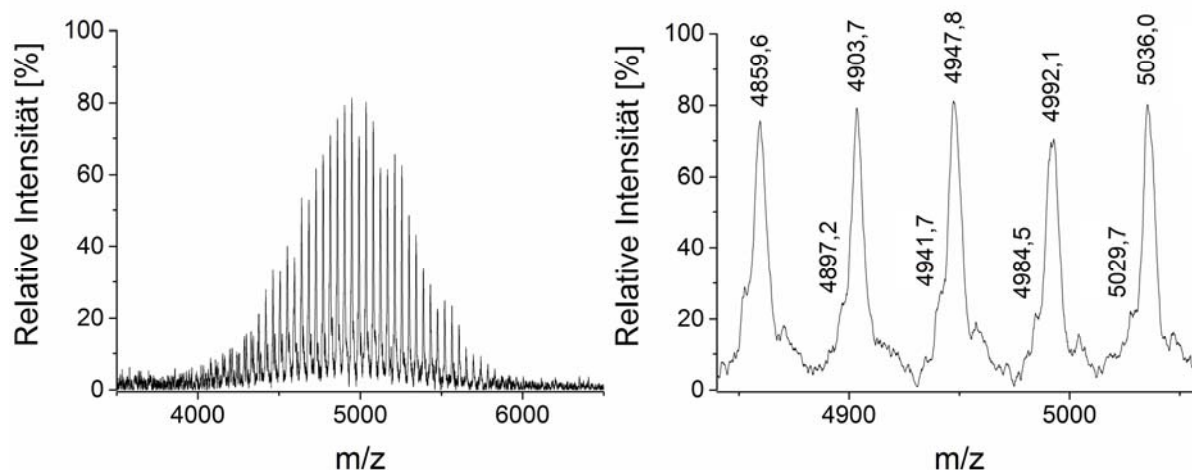


Abbildung 72. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVSKYWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4947,51 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4947,8 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4R8K}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,3$ g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z$ 4984,5 der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{Fam-G-LYAKDVSRVWHV-block-PEG}_{69}) + K]^+ = 4985,60$ Da mit einer Abweichung von $< 1,1$ g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4S-R}-PEG: Fam-G-LYARDVRSYWHV-block-PEG

Pep_{N4S-R}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

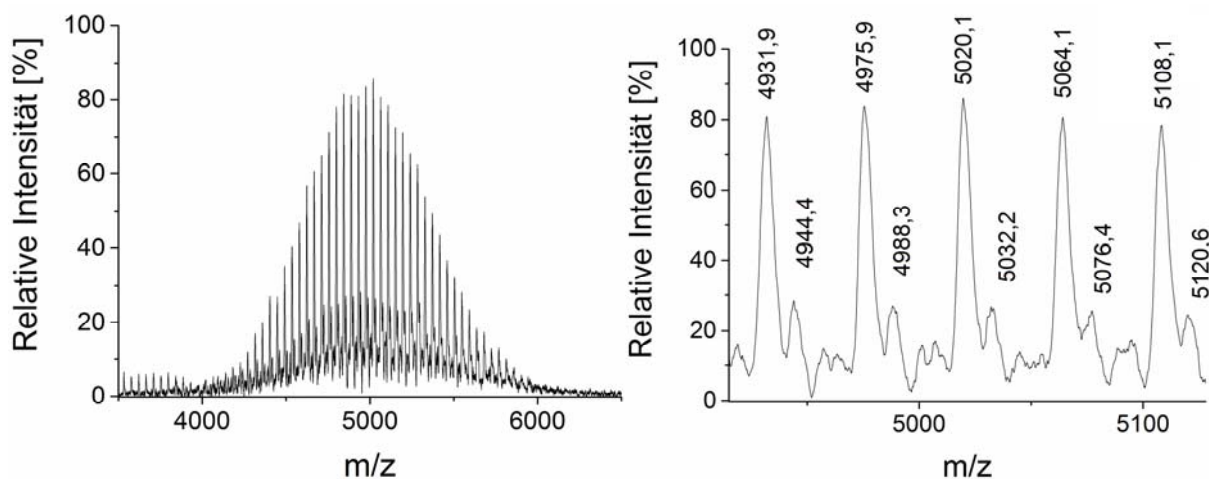


Abbildung 73. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LYARDVRSYWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}: 5019,58$ Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}: 5020,1$ Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4S-R}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,6$ g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4Y4}-PEG: Fam-G-LARYDVRSYWHV-block-PEG

Pep_{N4Y4}-PEG wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

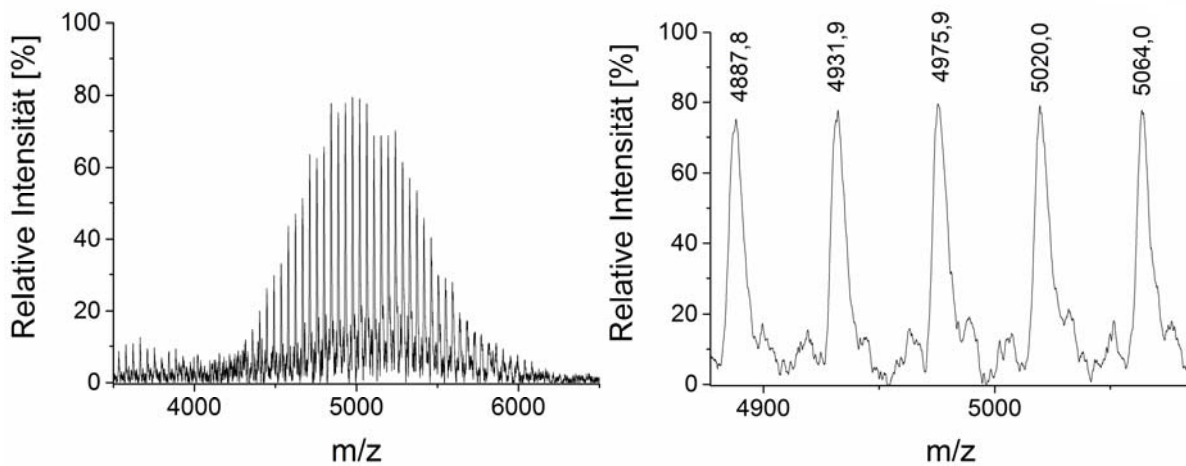


Abbildung 74. MALDI-TOF-MS von Fam-G-LARYDVRSYWHV-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 4975,53 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 4975,9 Da

Die Masse wurde mit 68 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können Pep_{N4Y4}-PEG mit einer Abweichung von $< 0,4$ g/mol zugeordnet werden.

Ref: FAM-GG-block-PEG

FAM-GG-PEG₃₀₀₀ wurde an TentaGel® PAP Harz (PEG-funktionalisiertes Peptidsyntheseharz, Beladung: 0,24 mmol/g; $M_n = 3000$ g/mol) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative FPLC aufgereinigt.

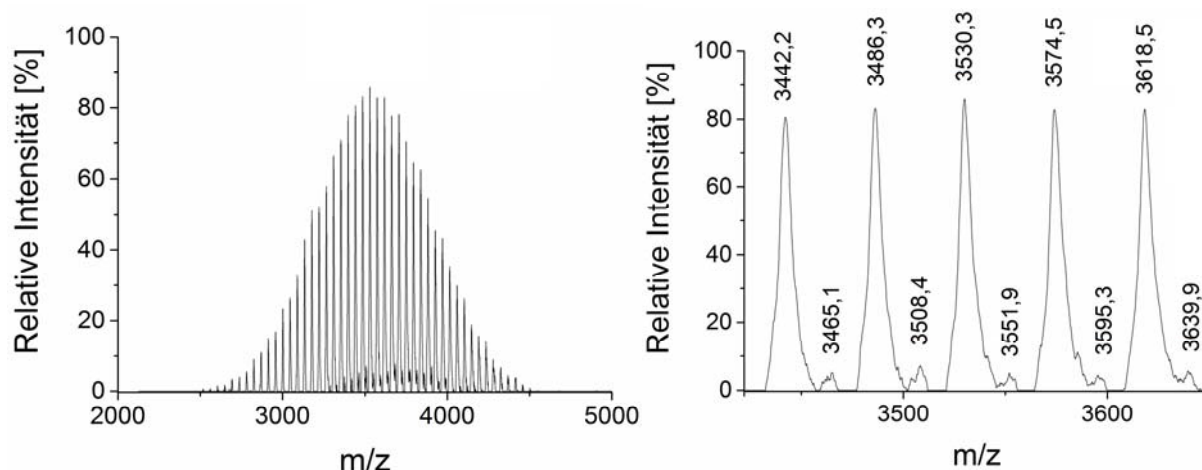


Abbildung 75. MALDI-TOF-MS von FAM-GG-block-PEG.

MS (MALDI-TOF) m/z :

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 3529,90 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 3530,3 Da

Die Masse wurde mit 69 EO-Einheiten ($\Delta m = 44,05$ m/z) berechnet. Die Signale können FAM-GG-PEG₃₀₀₀ mit einer Abweichung von $< 0,5$ g/mol zugeordnet werden.

Zusätzlich konnte die Masse des beobachteten Signals $M[\text{Peak}] = m/z$ 3551,9 der Verbindung mit der berechneten Masse $[M(\text{FAM-GG-block-PEG}_{69}) + \text{Na}]^+ = 3551,79$ Da mit einer Abweichung von $< 0,2$ g/mol zugeordnet werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, TFA- d , δ in ppm): 9.36-7.23 (m, 9 H, $9 \times \text{CH}_{\text{Ar,Fam}}$), 4.59-4.07 (m, 4 H, $2 \times \text{CH}_{2,\text{G}}$), 4.00-3.59 (m, 276 H, $\text{CH}_{2,\text{PEO}}$).

6.5.4 Peptide für mechanische Adhäsionsstudien

Pep_{N4}: *H-LYARDVSRVWHV-NH₂*

Pep_{N4} wurde an Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

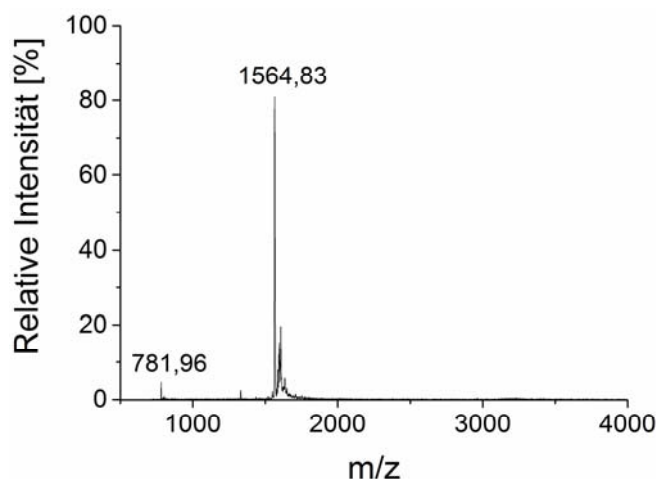


Abbildung 76. MALDI-TOF-MS von Pep_{N4}.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 1564,77 Da

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 782,89 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 1564,83 Da

$[M + 2H]^{2+}_{\text{gef.}}$: 781,96 Da

Die Signale können Pep_{N4} mit einer Abweichung von < 0,1 bzw. 0,9 g/mol zugeordnet werden.

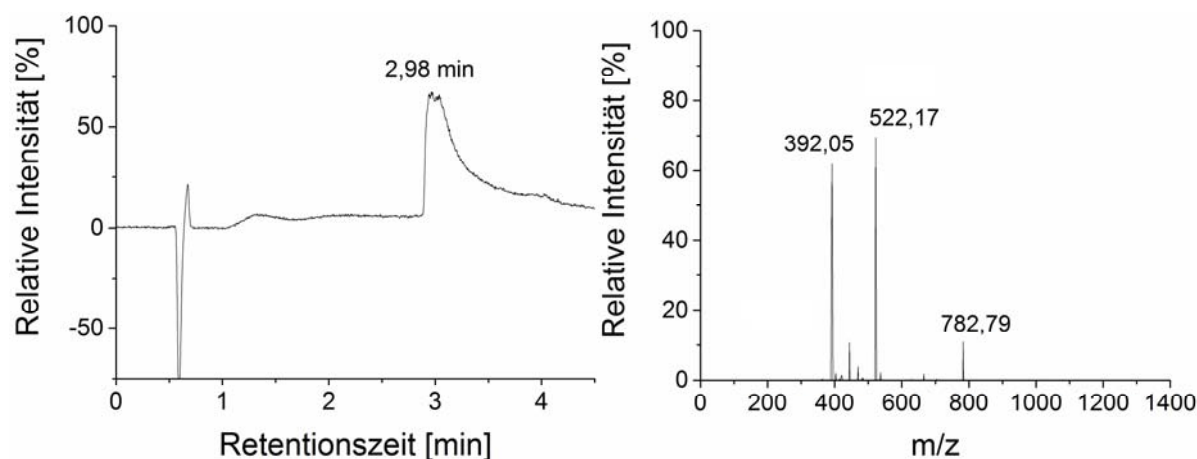


Abbildung 77. UPLC-Lauf (210 nm, 5-50% Acetonitril, 4 min) und ESI-MS-Spektrum von Pep_{N4}.

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 782,89 Da; $[M + 3H]^{3+}_{\text{ber.}}$: 522,26 Da; $[M + 4H]^{4+}_{\text{ber.}}$: 391,95 Da

Die gefundenen Signale können Pep_{N4} mit einer Abweichung von < 0,1 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4-K}: *H-KK-LYARDVSRVWHV-KK-NH₂*

Pep_{N4-K} wurde an Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

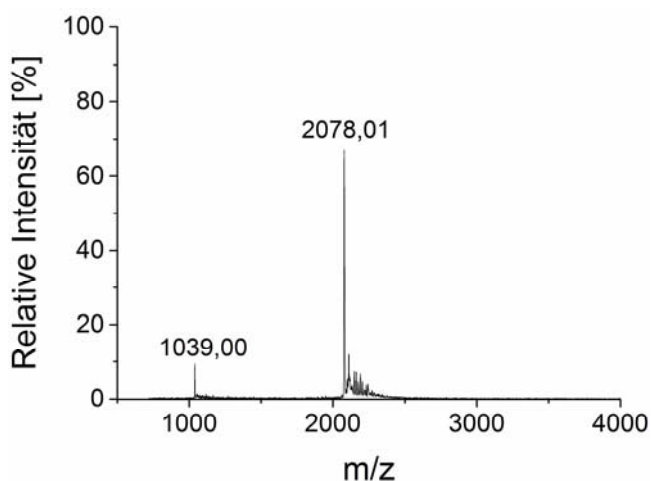


Abbildung 78. MALDI-TOF-MS von Pep_{N4-K}.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 2077,46 Da

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 1039,23 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 2078,01 Da

$[M + 2H]^{2+}_{\text{gef.}}$: 1039,00 Da

Die Signale können Pep_{N4-K} mit einer Abweichung von < 0,6 g/mol zugeordnet werden.

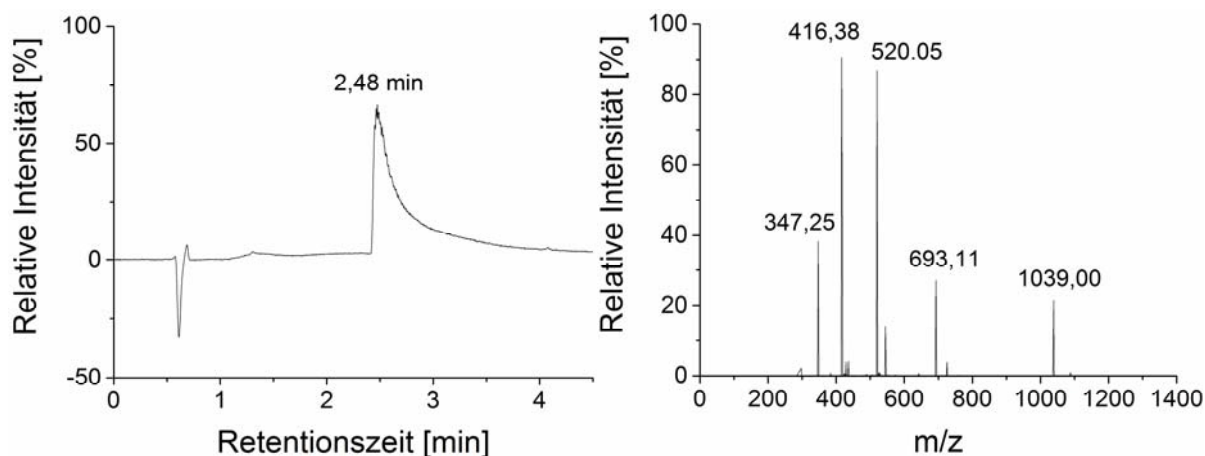


Abbildung 79. UPLC-Lauf (210 nm, 5-30% Acetonitril, 4 min) und ESI-MS-Spektrum von Pep_{N4-K}.

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 1039,23 Da; $[M + 3H]^{3+}_{\text{ber.}}$: 693,16 Da; $[M + 4H]^{4+}_{\text{ber.}}$: 520,12 Da;

$[M + 5H]^{5+}_{\text{ber.}}$: 416,30 Da; $[M + 6H]^{6+}_{\text{ber.}}$: 347,08 Da

Die gefundenen Signale können Pep_{N4-K} mit einer Abweichung von < 0,3 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4s-K}: H-KK-HRWYLRAVVDSY-KK-NH₂

Pep_{N4s-K} wurde an Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

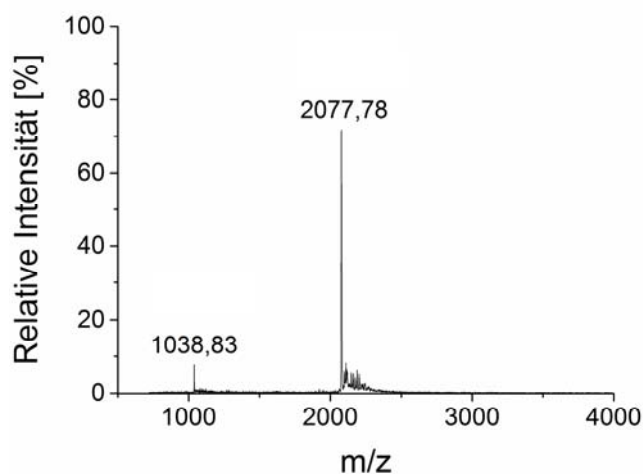


Abbildung 80. MALDI-TOF-MS von Pep_{N4s-K}.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 2077,46 Da $[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 1039,23 Da

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 2077,78 Da $[M + 2H]^{2+}_{\text{gef.}}$: 1038,83 Da

Die Signale können Pep_{N4s-K} mit einer Abweichung von < 0,4 bzw. 0,6 g/mol zugeordnet werden.

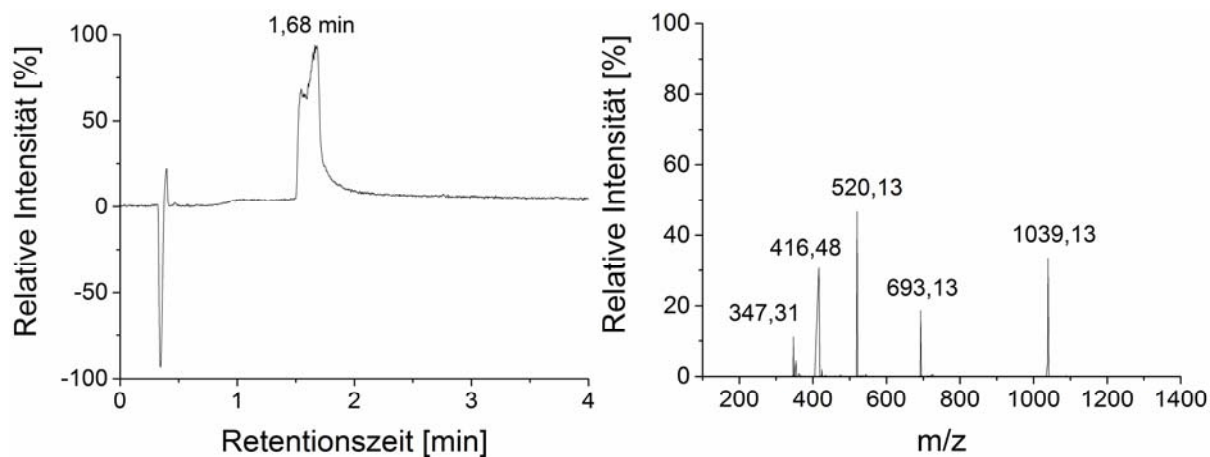


Abbildung 81. UPLC-Lauf (210 nm, 5-70% Acetonitril, 4 min) und ESI-MS-Spektrum von Pep_{N4s-K}.

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 1039,23 Da; $[M + 3H]^{3+}_{\text{ber.}}$: 693,16 Da; $[M + 4H]^{4+}_{\text{ber.}}$: 520,12 Da;

$[M + 5H]^{5+}_{\text{ber.}}$: 416,30 Da; $[M + 6H]^{6+}_{\text{ber.}}$: 347,08 Da

Die gefundenen Signale können Pep_{N4s-K} mit einer Abweichung von < 0,2 g/mol zugeordnet werden.

6.5.5 Peptide für mikroskopische Adhäsionsstudien

Pep_{N4-C}: H-LYARDVSRVWHV-GGGC-NH₂

Pep_{N4-C} wurde an Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

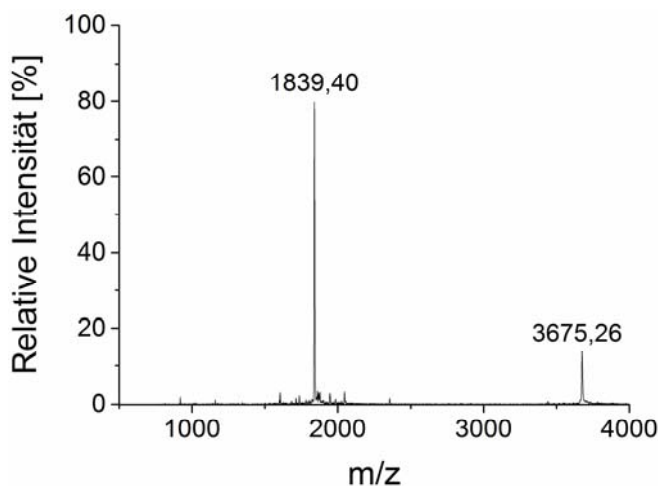


Abbildung 82. MALDI-TOF-MS von Pep_{N4-C}.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 1839,06 Da

$[2M-2H + H]^+_{\text{ber.}}$: 3675,11 Da (Disulfid-Dimer)

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 1839,40 Da

$[2M-2H + H]^+_{\text{gef.}}$: 3675,26 Da

Die Signale können Pep_{N4-C} mit einer Abweichung von < 0,4 g/mol zugeordnet werden.

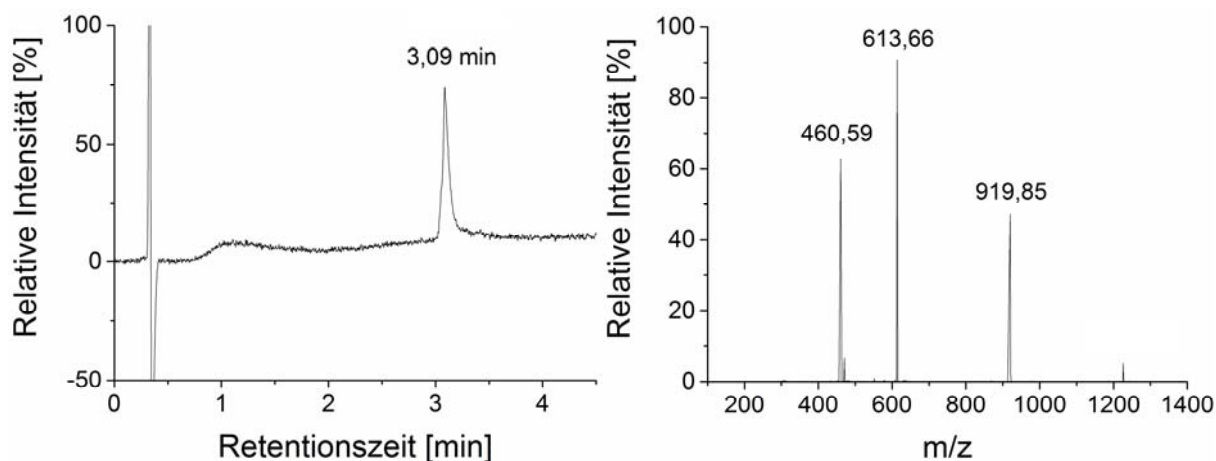


Abbildung 83. UPLC-Lauf (210 nm, 5-30% Acetonitril, 4 min) und ESI-MS-Spektrum von Pep_{N4-C}.

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 920,04 Da;

$[M + 3H]^{3+}_{\text{ber.}}$: 613,69 Da;

$[M + 4H]^{4+}_{\text{ber.}}$: 460,52 Da

Die gefundenen Signale können Pep_{N4-C} mit einer Abweichung von < 0,2 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4s-C}: H-HRWYLRAVVDSY-GGGC-NH₂

Pep_{N4s-C} wurde an Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

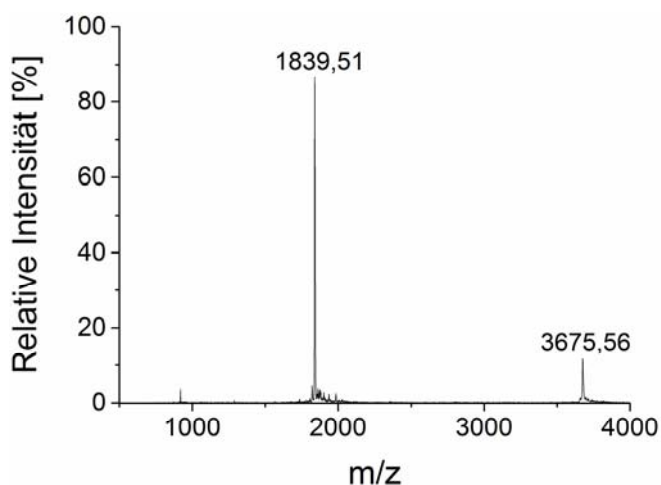


Abbildung 84. MALDI-TOF-MS von Pep_{N4s-C}.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 1839,06 Da

$[2M - 2H + H]^+_{\text{ber.}}$: 3675,11 Da (Disulfid-Dimer)

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 1839,51 Da

$[2M - 2H + H]^+_{\text{gef.}}$: 3675,56 Da

Die Signale können Pep_{N4s-C} mit einer Abweichung von < 0,5 g/mol zugeordnet werden.

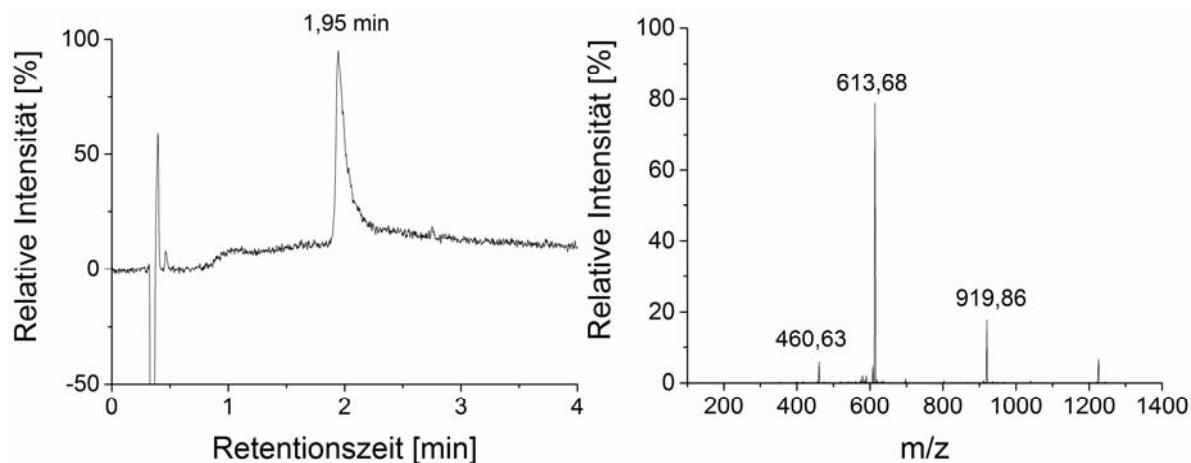


Abbildung 85. UPLC-Lauf (210 nm, 5-70% Acetonitril, 4 min) und ESI-MS-Spektrum von Pep_{N4s-C}.

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 920,04 Da; $[M + 3H]^{3+}_{\text{ber.}}$: 613,69 Da; $[M + 4H]^{4+}_{\text{ber.}}$: 460,52 Da

Die gefundenen Signale können Pep_{N4s-C} mit einer Abweichung von < 0,2 g/mol zugeordnet werden.

Pep_{N4s2-C}: H-DASYLYVRHWVR-GGGC-NH₂

Pep_{N4s2-C} wurde an Polystyrol-Fmoc-Rinkamid-Harz (Beladung: 0,59 mmol/g) aufgebaut und nach Freisetzung durch präparative HPLC aufgereinigt.

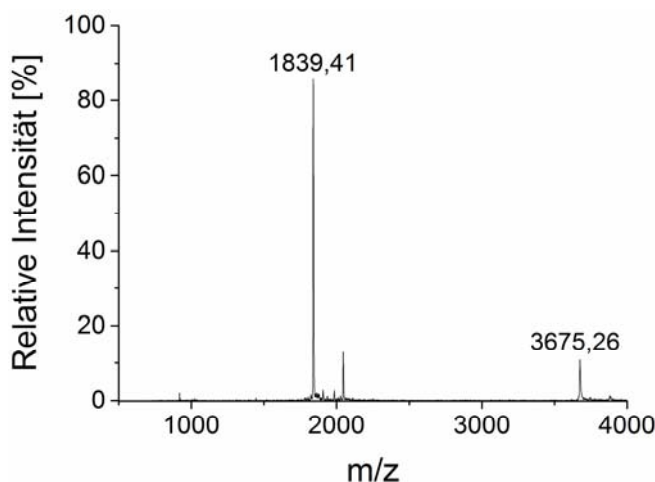


Abbildung 86. MALDI-TOF-MS von Pep_{N4s2-C}.

MS (MALDI-TOF) m/z:

$[M + H]^+_{\text{ber.}}$: 1839,06 Da

$[2M-2H + H]^+_{\text{ber.}}$: 3675,11 Da (Disulfid-Dimer)

$[M + H]^+_{\text{gef.}}$: 1839,41 Da

$[2M-2H + H]^+_{\text{gef.}}$: 3675,26 Da

Die Signale können Pep_{N4s2-C} mit einer Abweichung von < 0,4 g/mol zugeordnet werden.

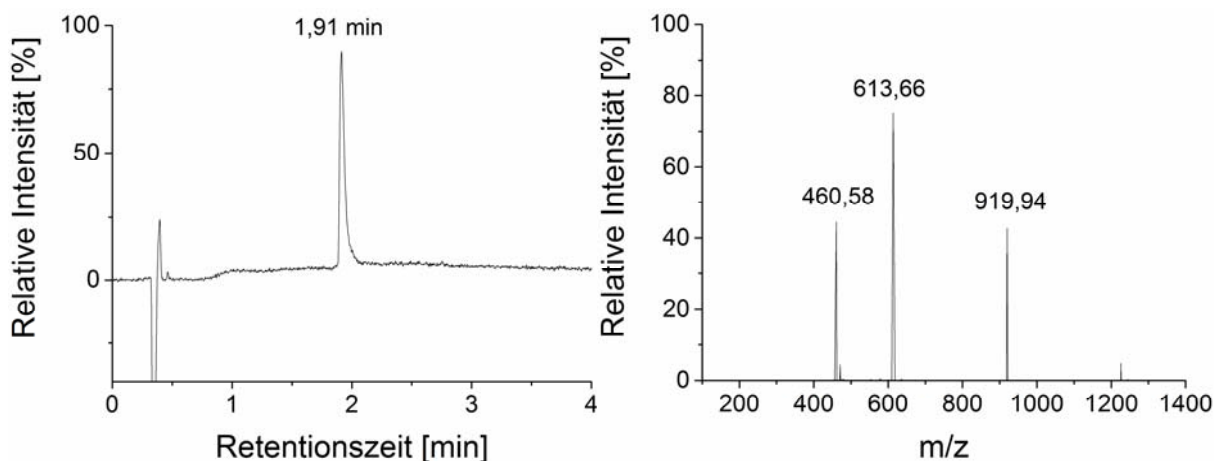


Abbildung 87. UPLC-Lauf (210 nm, 5-70% Acetonitril, 4 min) und ESI-MS-Spektrum von Pep_{N4s2-C}.

$[M + 2H]^{2+}_{\text{ber.}}$: 920,04 Da; $[M + 3H]^{3+}_{\text{ber.}}$: 613,69 Da; $[M + 4H]^{4+}_{\text{ber.}}$: 460,52 Da

Die gefundenen Signale können Pep_{N4s2-C} mit einer Abweichung von < 0,2 g/mol zugeordnet werden.

7. Literatur

- [1] a) F. D. Wit, J. Poulis, in *Advanced materials in automotive engineering*, Elsevier, **2012**, pp. 315-329; b) K. B. Katnam, L. F. M. Da Silva, T. M. Young, *Progress in Aerospace Sciences* **2013**, *61*, 26-42; c) A. Pizzi, K. L. Mittal, *Handbook of Adhesive Technology*, 3rd Edition, CRC Press, **2017**; d) T. A. Barnes, I. R. Pashby, *Journal of Materials Processing Technology* **2000**, *99*, 72-79; e) E. C. Botelho, R. A. Silva, L. C. Pardini, M. C. Rezende, *Materials Research* **2006**, *9*, 247-256.
- [2] S. Sun, M. Li, A. Liu, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2013**, *41*, 98-106.
- [3] a) G. C. Mays, A. R. Hutchinson, *Adhesives in civil engineering*, Cambridge University Press, **2005**; b) A. Pizzi, K. L. Mittal, *Wood adhesives*, CRC Press, **2011**.
- [4] a) A. Lauto, D. Mawad, L. J. R. Foster, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2008**, *83*, 464-472; b) F. Scognamiglio, A. Travan, I. Rustighi, P. Tarchi, S. Palmisano, E. Marsich, M. Borgogna, I. Donati, N. de Manzini, S. Paoletti, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2016**, *104*, 626-639.
- [5] M. A.-A. AlMa'adeed, I. Krupa, *Polyolefin Compounds and Materials*, Springer, **2016**.
- [6] D. Brewis, D. Briggs, *Polymer* **1981**, *22*, 7-16.
- [7] a) J. F. Smothers, S. Henikoff, P. Carter, *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *298*, 621-622; b) G. P. Smith, *Science (New York, N.Y.)* **1985**, *228*, 1315-1317; c) G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chemical reviews* **1997**, *97*, 391-410; d) G. P. Smith, *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 14428-14437.
- [8] F. Sanger, A. R. Coulson, *Journal of molecular biology* **1975**, *94*, 441-448.
- [9] a) M. L. Metzker, *Nature Reviews Genetics* **2009**, *11*, 31; b) E. L. van Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn, C. Thermes, *Trends in genetics : TIG* **2014**, *30*, 418-426; c) S. Goodwin, J. D. McPherson, W. R. McCombie, *Nature reviews. Genetics* **2016**, *17*, 333-351.
- [10] a) P. A. t Hoen, S. M. Jirka, B. R. Ten Broeke, E. A. Schultes, B. Aguilera, K. H. Pang, H. Heemskerk, A. Aartsma-Rus, G. J. van Ommen, J. T. den Dunnen, *Analytical biochemistry* **2012**, *421*, 622-631; b) U. Ravn, F. Gueneau, L. Baerlocher, M. Osteras, M. Desmurs, P. Malinge, G. Magistrelli, L. Farinelli, M. H. Kosco-Vilbois, N. Fischer, *Nucleic acids research* **2010**, *38*, e193; c) G. W. Liu, B. R. Livesay, N. A. Kacherovsky, M. Cieslewicz, E. Lutz, A. Waalkes, M. C. Jensen, S. J. Salipante, S. H. Pun, *Bioconjugate chemistry* **2015**, *26*, 1811-1817.
- [11] K. A. Gunay, H. A. Klok, *Bioconjugate chemistry* **2015**, *26*, 2002-2015.
- [12] P. A. Fay, *Adhesive Bonding Science, Technology and Application*, Cambridge, UK, **2005**.
- [13] J. Gegner, *Klebtechnik – multifunktionales Fügen für den nachhaltigen Werkstoffeinsatz im 21. Jahrhundert. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **2008**, *39*, 33-44.
- [14] W. Brockmann, P. L. Geiß, J. Klingen, B. Schröder, *Klebtechnik: Klebstoffe, Anwendungen und Verfahren*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
- [15] M. Doobe, *Kunststoffe erfolgreich kleben*, Springer Vieweg, Eltville, Germany **2018**.
- [16] D. Maga, M. Melchior, H. Henneken, D. Guse, A. Taden, N. Thonemann, *adhäsion KLEBEN & DICHTEN* **2017**, *61*, 16-23.
- [17] a) J. Byskov-Nielsen, J. V. Boll, A. H. Holm, R. Højsholt, P. Balling, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2010**, *30*, 485-488; b) K.-t. Lau, C. Gu, D. Hui, *Composites Part B: Engineering* **2006**, *37*, 425-436.
- [18] B. M. Rambo, H.-Y. Gong, M. Oh, J. L. Sessler, *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 1390-1401.
- [19] B. V. Derjaguin, I. N. Aleinikova, Y. P. Toporov, *Powder Technology* **1969**, *2*, 154-158.
- [20] a) M. N. Horenstein, *Journal of Electrostatics* **2009**, *67*, 384-393; b) A. G. Bailey, *Journal of Electrostatics* **1998**, *45*, 85-120.
- [21] A. Katsuhiko, P. H. Jonathan, V. L. Michael, V. Ajayan, C. Richard, A. Somobrata, *Science and Technology of Advanced Materials* **2008**, *9*, 014109.

- [22] a) H. Izadi, M. Golmakani, A. Penlidis, *Soft Matter* **2013**, 9, 1985-1996; b) D. Ruffatto, 3rd, A. Parness, M. Spenko, *Journal of the Royal Society, Interface* **2014**, 11, 20131089.
- [23] A. Baldan, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2012**, 38, 95-116.
- [24] S. S. Voyutskii, V. L. Vakula, *Journal of Applied Polymer Science* **1963**, 7, 475-491.
- [25] R. J. Wise, *Thermal Welding of Polymers*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, **1999**.
- [26] J. I. Velasco, J. A. De Saja, A. B. Martínez, *Journal of Applied Polymer Science* **1996**, 61, 125-132.
- [27] P. G. Gastone Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond. Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*, Oxford, **2009**.
- [28] D. J. Gardner, M. Blumentritt, L. Wang, N. Yildirim, *Reviews of Adhesion and Adhesives* **2014**, 2, 127-172.
- [29] F. Patat, *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1962**, 66, 769-769.
- [30] R. J. Good, *The Journal of Adhesion* **1972**, 4, 133-154.
- [31] H. Schonhorn, R. H. Hansen, *Journal of Applied Polymer Science* **1967**, 11, 1461-1474.
- [32] H. Schonhorn, F. W. Ryan, *Journal of Applied Polymer Science* **1974**, 18, 235-243.
- [33] S. Moritomi, T. Watanabe, S. Kanzaki, *Sumitomo Kagaku* **2010**, 1, 1-16.
- [34] H. A. Maddah, *American Journal of Polymer Science* **2016**, 6, 1-11.
- [35] M. F. Maitz, *Biosurface and Biotribology* **2015**, 1, 161-176.
- [36] E. M. Petrie, *Adhesive Bonding of Polyolefin*, Techsil Ltd., Warwickshire, UK, **2013**.
- [37] L. Vitos, A. V. Ruban, H. L. Skriver, J. Kollár, *Surface Science* **1998**, 411, 186-202.
- [38] A. Horsthemke, J. J. Schröder, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **1985**, 19, 277-285.
- [39] T. C. M. Chung, *Functionalization of Polyolefines*, Academic Press, **2002**.
- [40] H. D. K. Sutherland I, Brewis D M, Heath R J, Grassmeyer J, Waddington S, in *Adhesion Society 16th Annual Meeting*, **1993**, pp. 402-403.
- [41] L. G. Beholz, C. L. Aronson, A. Zand, *Polymer* **2005**, 46, 4604-4613.
- [42] F. Awaja, M. Gilbert, G. Kelly, B. Fox, P. Pigram, *Adhesion of polymers, Vol. 34*, **2009**.
- [43] a) O.-J. Kwon, S. Tang, S.-W. Myung, N. Lu, H.-S. Choi, *Surface and Coatings Technology* **2005**, 192, 1-10; b) J. Lai, B. Sunderland, J. Xue, S. Yan, W. Zhao, M. Folkard, B. D. Michael, Y. Wang, *Applied Surface Science* **2006**, 252, 3375-3379.
- [44] D. Zhang, Q. Sun, L. C. Wadsworth, *Polymer Engineering & Science* **1998**, 38, 965-970.
- [45] P. G. Pape, *Adhesion Promoters: Silane Coupling Agents in Applied Plastics Engineering Handbook* (Ed.: M. Kutz), William Andrew Publishing, Oxford, **2011**, pp. 503-517.
- [46] M. A. Aboudzadeh, S. M. Mirabedini, M. Atai, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2007**, 27, 519-526.
- [47] R. J. Clemens, G. N. Batts, J. E. Lawniczak, K. P. Middleton, C. Sass, *Progress in Organic Coatings* **1994**, 24, 43-54.
- [48] P. T. Klemarczyk, *The Journal of Adhesion* **1993**, 40, 81-91.
- [49] J. Yang, A. Garton, *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, 48, 359-370.
- [50] T. Matsumoto, Y. Nakanishi, C. Hongo, H. Hakukawa, S. Horiuchi, T. Nishino, *Polymer* **2018**, 137, 63-71.
- [51] M. F. Sonnenschein, S. P. Webb, P. E. Kastl, D. J. Arriola, B. L. Wendt, D. R. Harrington, N. G. Rondan, *Macromolecules* **2004**, 37, 7974-7978.
- [52] M. Li, Z. Zheng, S. Liu, W. Wei, X. Wang, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2011**, 31, 36-42.
- [53] a) M. F. Sonnenschein, S. P. Webb, R. C. Cieslinski, B. L. Wendt, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, 45, 989-998; b) M. F. Sonnenschein, S. P. Webb, B. L. Wendt, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2008**, 28, 126-134.
- [54] a) M. Li, Z. Zheng, S. Liu, Y. Su, W. Wei, X. Wang, *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2011**, 31, 565-570; b) M. Li, Z. Zheng, S. Liu, Y. Su, W. Wei, X. Wang, *Polymers for Advanced Technologies* **2012**, 23, 1077-1083.

- [55] T. Engels, Chapter 10 - Thermoset adhesives, in *Thermosets* (Second Edition) (Ed.: Q. Guo), Elsevier, **2018**, pp. 341-368.
- [56] J.-D. Mathias, M. Grédiac, P. Michaud, Bio-based adhesives, in *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials*, Elsevier, **2016**, pp. 369-385.
- [57] M. Guo, G. Wang, *Polymers* **2016**, *8*, 324.
- [58] P. Nordqvist, M. Lawther, E. Malmström, F. Khabbaz, *Industrial Crops and Products* **2012**, *38*, 139-145.
- [59] J. Rose, S. Pacelli, A. Haj, H. Dua, A. Hopkinson, L. White, F. Rose, *Materials* **2014**, *7*, 3106-3135.
- [60] B. P. Lee, P. B. Messersmith, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Annual Review of Materials Research* **2011**, *41*, 99-132.
- [61] J. H. Waite, *The Journal of Experimental Biology* **2017**, *220*, 517-530.
- [62] N. K. Kaushik, N. Kaushik, S. Pardeshi, J. G. Sharma, S. H. Lee, E. H. Choi, *Marine Drugs* **2015**, *13*, 6792-6817.
- [63] a) K. Kamino, *Biofouling* **2013**, *29*, 735-749; b) E. Hennebert, B. Maldonado, P. Ladurner, P. Flammang, R. Santos, *Interface focus* **2015**, *5*, 20140064.
- [64] D. S. Hwang, Y. Gim, H. J. Yoo, H. J. Cha, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3560-3568.
- [65] C. F. Martinez, Reiche Ernte im Bioreaktor, *Laborjournal* **2018**, *20/2018*.
- [66] L. Schmitt, C. Schwarz, S. H. J. Smits, *Patent Vol. EP2986633* (Numaferm GmbH), Deutschland, **2018**.
- [67] Zitat des Numaferm Gründers Christian Schwarz, 2019
- [68] C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. W. Hancock, G. Schneider, *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, *11*, 37.
- [69] D. Shin, D. Kim, W. Chung, Y. Lee, *Journal of biochemistry and molecular biology* **2005**, *38*, 517.
- [70] a) M. S. Packer, D. R. Liu, *Nature Reviews Genetics* **2015**, *16*, 379-394; b) F. H. Arnold, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 4143-4148.
- [71] a) K. Rübsam, B. Stomps, A. Böker, F. Jakob, U. Schwaneberg, *Polymer* **2017**, *116*, 124-132; b) K. Rübsam, L. Weber, F. Jakob, U. Schwaneberg, *Biotechnology and Bioengineering* **2018**, *115*, 321-330; c) K. Rübsam, M. D. Davari, F. Jakob, U. Schwaneberg, *Polymers* **2018**, *10*, 423.
- [72] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *249*, 386-390.
- [73] B. P. Gray, K. C. Brown, *Chemical reviews* **2014**, *114*, 1020-1081.
- [74] D. J. Rodi, A. S. Soares, L. Makowski, *Journal of molecular biology* **2002**, *322*, 1039-1052.
- [75] L. F. Wang, M. Yu, *Current drug targets* **2004**, *5*, 1-15.
- [76] a) J. M. Reichert, C. J. Rosensweig, L. B. Faden, M. C. Dewitz, *Nature biotechnology* **2005**, *23*, 1073-1078; b) T. Holger, M. Torsten, S. Thomas, H. Michael, D. Stefan, *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2008**, *9*, 439-446.
- [77] a) M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nature materials* **2003**, *2*, 577-585; b) P. Wilke, N. Helfricht, A. Mark, G. Papastavrou, D. Faivre, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 12667-12674.
- [78] S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, A. M. Belcher, *Nature* **2000**, *405*, 665-668.
- [79] T. Schwemmer, J. Baumgartner, D. Faivre, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 2385-2391.
- [80] N. B. Adey, A. H. Mataragnon, J. E. Rider, J. M. Carter, B. K. Kay, *Gene* **1995**, *156*, 27-31.
- [81] T. Serizawa, T. Sawada, H. Matsuno, T. Matsubara, T. Sato, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 13780-13781.
- [82] E. Fukusaki, K. Ogawa, A. Okazawa, S. i. Kajiyama, A. Kobayashi, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, Vol. *28*, **2004**, 4-6, 181-184
- [83] T. Serizawa, K. Iida, H. Matsuno, K. Kurita, Cellulose-binding Heptapeptides Identified by Phage Display Methods, *Chemistry Letters*, Vol. *36*, **2007**.
- [84] a) W. Beck, J. O'Brien, H. Wang, *Patent Vol. US20070065387A1*, Polypropylene Binding Peptides and Methods of Use. (E. I. du Pont de Nemours and Company), USA, **2007**; b) S. D. Cunningham, D. J. Lowe, J. P. O'Brien, H. Wang, A. E. Wilkins, *Patent Vol. US 7,928,076 B2*,

- Method for enhancing the effect of particulate benefit agents. (E. I. du Pont de Nemours and Company), USA, **2011**.
- [85] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent, L. E. Hood, *Nature* **1986**, *321*, 674-679.
 - [86] J. Shendure, S. Balasubramanian, G. M. Church, W. Gilbert, J. Rogers, J. A. Schloss, R. H. Waterston, *Nature* **2017**, *550*, 345.
 - [87] C. International Human Genome Sequencing, *Nature* **2004**, *431*, 931-945.
 - [88] M. Schirmer, U. Z. Ijaz, R. D'Amore, N. Hall, W. T. Sloan, C. Quince, *Nucleic acids research* **2015**, *43*, e37-e37.
 - [89] E. Dias-Neto, D. N. Nunes, R. J. Giordano, J. Sun, G. H. Botz, K. Yang, J. C. Setubal, R. Pasqualini, W. Arap, *PloS one* **2009**, *4*, e8338.
 - [90] I. Rentero Rebollo, M. Sabisz, V. Baeriswyl, C. Heinis, *Nucleic acids research* **2014**, *42*, e169.
 - [91] T. L. Bailey, M. Boden, F. A. Buske, M. Frith, C. E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li, W. S. Noble, *Nucleic acids research* **2009**, *37*, W202-W208.
 - [92] W. L. Matochko, R. Derda, *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **2013**, *2013*, 13.
 - [93] W. L. Matochko, S. Cory Li, S. K. Tang, R. Derda, *Nucleic acids research* **2014**, *42*, 1784-1798.
 - [94] a) W. L. Matochko, S. Ng, M. R. Jafari, J. Romaniuk, S. K. Tang, R. Derda, *Methods (San Diego, Calif.)* **2012**, *58*, 18-27; b) Y. J. Che, H. W. Wu, L. Y. Hung, C. A. Liu, H. Y. Chang, K. Wang, G. B. Lee, *Biomicrofluidics* **2015**, *9*, 054121; c) K. Cung, R. L. Slater, Y. Cui, S. E. Jones, H. Ahmad, R. R. Naik, M. C. McAlpine, *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 562-565.
 - [95] A. Kape, B. Ruick, S. Drusch, *Chemical Engineering Research and Design* **2016**, *110*, 152-159.
 - [96] M. Lindner, N. Rodler, M. Jesdinszki, M. Schmid, S. Sänglerlaub, *Journal of Applied Polymer Science* **2018**, *135*, 45842.
 - [97] S. Guimond, I. Radu, G. Czeremuskin, D. J. Carlsson, M. R. Wertheimer, *Plasmas and Polymers* **2002**, *7*, 71.
 - [98] I. Sutherland, R. P. Popat, D. M. Brewis, R. Calder, *The Journal of Adhesion* **1994**, *46*, 79-88.
 - [99] J. C. Lascovich, R. Giorgi, S. Salvatore, *Applied Surface Science Vol. 47*, **1991**, 17-21.
 - [100] S.D. Cunningham, D. J. Lowe, J.P. O'Brien, H. Wang, A.E. Wilkins, *Patent Vol. US7928076B2*, Polypropylene Binding Peptides and Methods of Use. (E. I. du Pont de Nemours and Company), **2006**.
 - [101] New England Biolabs. Weblink: <https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale8101.pdf?rev=727daa51090748f59bfe441d69f2a8f3>
 - [102] J. Huang, B. Ru, P. Zhu, F. Nie, J. Yang, X. Wang, P. Dai, H. Lin, F.-B. Guo, N. Rao, *Nucleic acids research* **2012**, *40*, D271-D277.
 - [103] a) Y. Ding, X. Hua, N. Sun, J. Yang, J. Deng, H. Shi, M. Wang, *The Science of the total environment* **2017**, *609*, 854-860; b) C. S. Cheung, K. W. Anderson, P. M. Patel, K. L. Cade, K. W. Phinney, I. V. Turko, *Scientific reports* **2017**, *7*, 42497.
 - [104] a) X. Li, X. Huang, J. Zhang, H. Huang, L. Zhao, M. Yu, Y. Zhang, H. Wang, *Oncology reports* **2018**, *40*, 2935-2943; b) D. Yu, Z. Du, W. Li, H. Chen, S. Ye, A. R. Hoffman, J. Cui, J. F. Hu, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **2017**, *42*, 519-529.
 - [105] a) K. T. H. Nguyen, M. A. Adamkiewicz, L. E. Hebert, E. M. Zygiel, H. R. Boyle, C. M. Martone, C. B. Meléndez-Ríos, K. A. Noren, C. J. Noren, M. F. Hall, *Analytical biochemistry* **2014**, *462*, 35-43; b) H. M. Zade, R. Keshavarz, H. S. Z. Shekarabi, B. Bakhshinejad, *Amino Acids* **2017**, *49*, 1293-1308.
 - [106] G. Li, Q. Yin, H. Ji, Y. Wang, H. Liu, L. Jiang, F. Zhu, B. Li, *Drug design, development and therapy* **2018**, *12*, 3899-3912.
 - [107] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, J. A. M. Leunissen, *Nucleic acids research* **2007**, *35*, 71-74; <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.
 - [108] T. J. Conrad, C.; Börner, H. G., *NGS4Mater.Sci.* **2020**. DOI: <https://doi.org/10.18452/21236>
 - [109] B. Ewing, L. Hillier, M. C. Wendl, P. Green, *Genome Research* **1998**, *8*, 175-185.

- [110] Y. Yang, M. J. Hu, T. C. Jin, Y. X. Zhang, G. Y. Liu, Y. B. Li, M. L. Zhang, M. J. Cao, W. J. Su, G. M. Liu, *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **2019**, *49*, 108-119.
- [111] M. Vodnik, U. Zager, B. Strukelj, M. Lunder, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2011**, *16*, 790-817.
- [112] L. A. Brammer, B. Bolduc, J. L. Kass, K. M. Felice, C. J. Noren, M. F. Hall, *Analytical biochemistry* **2008**, *373*, 88-98.
- [113] W. L. Matochko, K. Chu, B. Jin, S. W. Lee, G. M. Whitesides, R. Derda, *Methods (San Diego, Calif.)* **2012**, *58*, 47-55.
- [114] R. J. Sundberg, R. B. Martin, *Chemical reviews* **1974**, *74*, 471-517.
- [115] S.-M. Liao, Q.-S. Du, J.-Z. Meng, Z.-W. Pang, R.-B. Huang, *Chemistry Central Journal* **2013**, *7*, 44.
- [116] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chemical reviews* **1997**, *97*, 1303-1324.
- [117] K. Gebhardt, V. Lauvrak, E. Babaie, V. Eijsink, B. H. Lindqvist, *Peptide research* **1996**, *9*, 269-278.
- [118] H. Anni, O. Nikolaeva, Y. Israel, Selection of phage-display library peptides recognizing ethanol targets on proteins, *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* **2001**, *25*, 201-209.
- [119] X. Qiang, K. Sun, L. Xing, Y. Xu, H. Wang, Z. Zhou, J. Zhang, F. Zhang, B. Caliskan, M. Wang, Z. Qiu, *Scientific reports* **2017**, *7*, 2673.
- [120] G. Bulaj, T. Kortemme, D. P. Goldenberg, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8965-8972.
- [121] a) M. d. Vestergaard, S. Matsumoto, S. Nishikori, K. Shiraki, K. Hirata, M. Takagi, *Analytical Sciences* **2008**, *24*, 277-281; b) N. J. Pace, E. Weerapana, *Biomolecules* **2014**, *4*, 419-434; c) R. N. V. Krishna Deepak, B. Chandrakar, R. Sankararamakrishnan, *Biophysical chemistry* **2017**, *224*, 32-39.
- [122] M. Tolinski, *Additives For Polyolefines: Getting the Most Out of Polypropylene, Polyethylene and TPO*, Elsevier, **2015**.
- [123] A. Ikai, *Journal of biochemistry* **1980**, *88*, 1895-1898.
- [124] D. S. Moore, *Biochemical Education* **1985**, *13*, 10-11.
- [125] J. Kyte, R. F. Doolittle, *Journal of molecular biology* **1982**, *157*, 105-132.
- [126] A. Radzicka, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1988**, *27*, 1664-1670.
- [127] H. G. Boman, *Journal of Internal Medicine* **2003**, *254*, 197-215.
- [128] G. Liang, Z. Li, *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26*, 754-763.
- [129] S. S. Sidhu, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 14-25.
- [130] L. D. Unsworth, H. Sheardown, J. L. Brash, *Langmuir* **2008**, *24*, 1924-1929.
- [131] P. Mishra, B. Nayak, R. K. Dey, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *11*, 337-348.
- [132] R. Klein, F. R. Wurm, *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, *36*, 1147-1165.
- [133] J. Herzberger, K. Niederer, H. Pohlit, J. Seiwert, M. Worm, F. R. Wurm, H. Frey, *Chemical reviews* **2016**, *116*, 2170-2243.
- [134] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, 1-39.
- [135] Innovagen, *PepCalc.com - Peptide property calculator*. **2015** [besucht 2019; <https://pepcalc.com/>].
- [136] G. R. Grimsley, J. M. Scholtz, C. N. Pace, *Protein Sci* **2009**, *18*, 247-251.
- [137] a) P. Beneš, M. Paulenová, *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **1973**, *251*, 766-771; b) P. J. Sides, J. D. Hoggard, *Langmuir* **2004**, *20*, 11493-11498.
- [138] J. E. Donald, D. W. Kulp, W. F. DeGrado, *Proteins* **2011**, *79*, 898-915.
- [139] a) S. Pylaeva, M. Brehm, D. Sebastiani, *Scientific reports* **2018**, *8*, 13626; b) Z. S. Hendsch, B. Tidor, *Protein Sci* **1994**, *3*, 211-226.
- [140] R. Ferreira de Freitas, M. Schapira, *MedChemComm* **2017**, *8*, 1970-1981.
- [141] Scrambled Peptide Generator. [besucht 2019; <http://www.mimotopes.com/peptideLibraryScreening.asp?id=97>].
- [142] a) L. H. Dubois, B. R. Zegarski, R. G. Nuzzo, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 570-579; b) R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, D. L. Allara, *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 2358-2368.

-
- [143] E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M. H. Fonticelli, G. Benítez, A. A. Rubert, R. C. Salvarezza, *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 1183-1192.
- [144] T. Heida, J. W. Neubauer, M. Seuss, N. Hauck, J. Thiele, A. Fery, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2017**, *218*, 1600418.
- [145] H.-J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, *Surface Science Reports* **2005**, *59*, 1-152.
- [146] M. Seuss, A. Fery, *MaxSeuss/AFM-Force-Curve-Analyzer-IgorPro: AFM Force Curve Analyzer for IgorPRO*. **2018**: doi:10.5281/zenodo.1208549.
- [147] M. Munz, A. Bella, S. Ray, N. C. Bell, A. G. Shard, C. Minelli, *Biointerphases* **2016**, *11*, 04b312.
- [148] U. Reineke, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, *12*, 59-64.
- [149] G. Zhang, X. Li, M. Jiang, C. Wu, *Langmuir* **2000**, *16*, 9205-9207.
- [150] J. L. Hutter, J. Bechhoefer, *Review of Scientific Instruments* **1993**, *64*, 1868-1873.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftspektroskopie
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CPO	Chlorierte Polyolefine
DCM	Dichlormethan
ddNTP	Dedesoxynukleotidtriphosphates
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphaten
Dopa	Dihydroxyphenylalanin
E. coli	Escherichia coli
et al.	et alli (dt. und andere)
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
FASGAI	Factor Analysis Scale of Generalized Amino Acid Information
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	Fast protein liquid chromatography
gef.	gefunden
GRAVY	Hydrophobie-Index
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCTU	(2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
LCI	Antimikrobielles Peptid gefunden in <i>Bacillus subtilis</i>
MALDI/TOF	Matrix assisted laser desorption and ionization / time of flight
MEME	Multiple Em for Motif Elicitation (Algorithmus)
M _n	Zahlenmittel der Molmasse eines Polymers
MS	Massenspektrometrie
M _w	Massenmittel der Molmasse eines Polymers
NGS	Next-Generation-Sequenzierung
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon

OBOC	One-bead-one-compound
OWRK	Modell nach Owens, Wendt, Rabe und Kaelbe
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PE	Polyethylen
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Polypropylen
PP _{cor} ; PP _{unb} ; PP _{iso}	Corona-behandeltes PP; unbehandeltes PP; isotaktisches PP
PSA	Pressure sensitive adhesives
PTFE	Polytetrafluorethylen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluoro-phosphat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SAROTUP	Scanner And Reporter Of Target-Unrelated Peptides
SPOT	Synthetic Peptide Arrays on Membrane Supports
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Hans Börner für die Möglichkeit danken meine Dissertation in seinem Arbeitskreis durchzuführen, für die Unterstützung während dieser Zeit und für die Bereitstellung des spannenden Promotionsthemas. Das interdisziplinäre Thema ermöglichte mir weit über die klassische Chemie hinaus zu forschen und auch in Themengebiete der Biotechnologie und Materialwissenschaften einzutauchen. Hans Börner hat mir durch seine Industriekontakte und Kooperationen die Möglichkeit geboten sehr industrie- und anwendungsnah zu forschen, wofür ihm mein ausgesprochener Dank gilt.

Daneben danke ich besonders Dr. Michael Weller für die Zweitbetreuung meiner Promotion und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis an der BAM. Vor allem möchte ich Michael Weller dafür danken, dass er immer Zeit für Gespräche und meine Fragen hatte. Seine guten Ideen haben mir vor allem in der zweiten Hälfte der Promotion an schwierigen Stellen oft entscheidend geholfen.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonderer Dank der School of Analytical Sciences Adlershof (SALSA) für das Stipendium, welches meine Promotion überhaupt erst möglich machte und die Möglichkeit neben der Laborarbeit an Kursen und Vorlesungen teilzunehmen. Außerdem möchte ich SALSA für die Finanzierung meiner Teilnahme an drei Konferenzen in den USA danken. Allen SALSA Fellows danke ich für die tolle gemeinsame Zeit.

Der Firma Henkel und insbesondere Dr. Andreas Taden danke ich für die Bereitstellung der PP-Folien und die aufschlussreichen Gespräche.

Dr. Tim Conrad möchte ich ganz besonders für die Erstellung des Computerprogramms zur Auswertung der vielen Millionen Phagen-Sequenzen danken, ohne das das ganze Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem danke ich Prof. Oliver Seitz und Prof. Christoph Arenz dafür, dass ich einen Teil des S1-Genlabors für meine Phagendisplay-Experimente nutzen durfte. Mein Dank gilt außerdem Christina Klotz vom Arbeitskreis Seitz für die Hilfe beim Erlernen der neuen Methoden, welche ich im Rahmen meiner Arbeit im Genlabor kennenlernen durfte.

Dann möchte ich dem gesamten Arbeitskreis Börner für die Unterstützung danken, vor allem meinem Laborkollegen Dr. Justus Horsch, und besonders Dr. Patrick Wilke dafür, dass er mir ganz am Anfang meiner Promotion die Phagendisplay-Methode zeigte.

Weiterer Dank gilt Dr. Corinna Altmann von der BAM für die XPS-Messungen meiner PP-Folien sowie Dr. Uwe Beck und vor allem Thorid Lange von der BAM für Möglichkeit die Zugversuche mit der Zentrifugentechnologie durchzuführen. Dr. Johannes Schmidt vom Arbeitskreis von Prof. Arne Thomas möchte ich für die XPS-Messungen danken.

Dr. Maximilian Seuss und Prof. Andreas Fery vom Leibniz-Institut für Polymerforschung in Dresden danke ich für die AFM-Messungen der Phagenpeptide. Besonders toll war es, dass Maximilian Seuss noch nach Ende seiner Promotion die vielen AFM-Messdaten für mich ausgewertet hat. Ganz besonders möchte auch ich Dr. Philipp Witwer für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mir während aller Hoch- und Tiefphasen dieses vierjährigen Projektes immer zur Seite standen.